

Документ подписан простой электронной подписью
Информация о владельце:
ФИО: Таскаев Сергей Валерьевич
Должность: Ректор
Дата подписания: 17.09.2025 10:55:58
Уникальный программный ключ:
04c19ed8bfb28f3b6cb77a486b9a8788b8322323



МИНОБРАЗОВАНИЯ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Челябинский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ЧелГУ»)

Фонд оценочных средств по дисциплине «Современные проблемы биотехнологии» по направлению подготовки 06.04.01 «Биология» ФГБОУ ВО «ЧелГУ»

стр. 1

**Фонд оценочных средств
промежуточной аттестации
по дисциплине**

Современные проблемы биотехнологии

**Направление подготовки (специальность)
06.04.01 Биология**

**Направленность (профили)
Медико-биологические науки, Микробиология и вирусология,
Биотехнология**

**Присваиваемая квалификация
Магистр**

Форма обучения Очная

Челябинск, 2025

1.

ПАСПОРТ ФОНДА ОЦЕНОЧНЫХ СРЕДСТВНаправление подготовки: **06.04.01 Биология**Направленность (магистерская программа): Медико-биологические науки,
Микробиология и вирусология, БиотехнологияДисциплина: **Современные проблемы биотехнологии**

Семестры изучения: 3

Форма промежуточной аттестации: зачет

2. ПЕРЕЧЕНЬ ФОРМИРУЕМЫХ КОМПЕТЕНЦИЙ**2.1. Компетенции, закреплённые за дисциплиной**

Изучение дисциплины «Современные проблемы биотехнологии» направлено на формирование следующих компетенций:

Коды компетенции и (по ФГОС)	Содержание компетенций согласно ФГОС	Коды и содержание компетенций	Перечень планируемых результатов обучения по дисциплине
1	2		3
ПК-1	Способен использовать знание нормативных документов, регламентирующих организацию проведения научно-исследовательских работ для руководства рабочим коллективом и обеспечения мер производственной безопасности	ПК-1.3 Планирует организацию и проведение научных исследований по актуальным биомедицинским проблемам	Знать: Для достижения ПК-1.3 знать: основы логического мышления; основные разделы и содержание современной биотехнологии; понятия и закономерности смежных дисциплин Уметь: Для достижения ПК-1.3 уметь: теоретически моделировать процессы, происходящие в биологической системе и за ее пределами; использовать методы смежных наук в биологии; анализировать имеющуюся информацию и на основе этого делать обоснованные выводы о состоянии биологической систем Владеть: Для достижения ПК-1.3 владеть: культурой системного мышления для достижения поставленной цели и задач исследования различных систем человека и животных

ПК-2	Способен применять методы культивирования, идентификации, геномики и протеомики микроорганизмов и использовать их в решении проблем в соответствии с направленностью (профилем) программы магистратуры	ПК-2.1 Применяет методы бактериологического, молекулярно-генетического, биотехнологического исследования;	Знать: Для достижения ПК-2.1 знать: базовые представления об актуальных вопросах современной биотехнологии Уметь: Для достижения ПК-2.1 уметь: самостоятельно искать и анализировать информацию, применять знания фундаментальных и прикладных разделов современной биотехнологии в научно-исследовательской деятельности; генерировать новые идеи и методические решения в области биологических наук Владеть: Для достижения ПК-2.1 владеть: теорией и практикой решения интеллектуальных биологических задач
-------------	--	---	---

3. СОДЕРЖАНИЕ ОЦЕНОЧНЫХ СРЕДСТВ ПО ДИСЦИПЛИНЕ

3.1 Виды оценочных средств

№ п/п	Код компетенции/планируемые результаты обучения	Контролируемые темы/разделы	Наименование оценочного средства для текущего контроля	Наименование оценочного средства на промежуточной аттестации № задания
1	ПК-1 Знать: Для достижения ПК-1.3 знать: основы логического мышления; основные разделы и содержание современной биотехнологии; понятия и закономерности смежных дисциплин Уметь: Для достижения ПК-1.3 уметь: теоретически моделировать процессы, происходящие в биологической системе и за ее пределами; использовать методы смежных наук в биологии; анализировать имеющуюся информацию и на основе этого делать обоснованные выводы о состоянии биологической систем Владеть: Для достижения ПК-1.3 владеть: культурой системного мышления для достижения поставленной цели и задач исследования различных систем человека и животных	1. Основные направления современной биотехнологии. 2. Тканевая инженерия. 3. Генно-модифицированные организмы. 4. Биотехнологии в онкологии. 5. Биотехнологии в охране окружающей среды.	1. Эссе по теме «Нобелевские лауреаты». 2. Доклад по ситуационной задаче. 3. Контрольная работа.	Вопросы зачета № 1-23.

2	ПК-2 Знать: Для достижения ПК-2.1 знать: базовые представления об актуальных вопросах современной биотехнологии Уметь: Для достижения ПК-2.1 уметь: самостоятельно искать и анализировать информацию, применять знания фундаментальных и прикладных разделов современной биотехнологии в научно-исследовательской деятельности; генерировать новые идеи и методические решения в области биологических наук Владеть: Для достижения ПК-2.1 владеть: теорией и практикой решения интеллектуальных биологических задач	1. Основные направления современной биотехнологии. 2. Тканевая инженерия. 3. Генно-модифицированные организмы. 4. Биотехнологии в онкологии. 5. Биотехнологии в охране окружающей среды.	1. Эссе по теме «Нобелевские лауреаты». 2. Доклад по ситуационной задаче. 3. Контрольная работа.	Вопросы зачета № 1-23.
---	--	---	---	------------------------

Примечание: типовые задания, критерии и показатели оценивания в рамках текущего контроля представлены в рабочей программе дисциплины (модуля). Полные комплекты оценочных средств и контрольно-измерительных материалов хранятся на кафедре.

3.2 Содержание оценочных средств

Оценочные средства для промежуточной аттестации по дисциплине «Современные проблемы биотехнологии» представлены в виде вопросов к зачету.

Вопросы к зачету с ответами

1. Основные направления современной биотехнологии.

а) **Пищевая биотехнология** – это производство в промышленных масштабах продуктов питания и биологически активных добавок к пище с помощью живых систем.

Пищевая биотехнология занимается:

1. созданием генно-модифицированной и искусственной пищи;
2. производством пищевых добавок, повышающих питательную ценность пищи и ее полезные свойства (Например, производство незаменимых аминокислот и микробного белка пищевого назначения (используют в производстве хлеба).
3. использованием микроорганизмов как ферментативных систем в производстве продуктов питания (приготовление хлеба, вина, пива, кисломолочных продуктов, квашение капусты).

б) **Фармацевтическая биотехнология** – использование живых организмов для производства лекарственных веществ.

Биотехнология предлагает новые подходы к разработке и производству лекарственных, профилактических и диагностических медицинских препаратов.

1. Лекарственные препараты: антибиотики – в настоящее время это самый большой класс лекарственных препаратов, основными продуцентами которых являются микроорганизмы; гормоны – стероидные гормоны, соматотропный гормон, пищеварительные ферменты и т.д.

2. Профилактические препараты (вакцины). Данный вид продукции не имеет дублеров в химической промышленности. В настоящее время большое количество патогенных антигенов вырабатывается генно-модифицированными непатогенными микроорганизмами.

3. Диагностические препараты: все современные методы диагностики заболеваний человека (ИФА, ПЦР) используют тест-системы, полученные с помощью биотехнологии (моноклональные АТ – гибридомы; ферменты для репликации и транскрипции - микроорганизмы).

в) **Инженерная энзимология** – отрасль биотехнологии, базирующаяся на использовании каталитических функций ферментов в изолированном состоянии или в составе живых клеток для получения соответствующих целевых продуктов.

В настоящее время чаще всего используют иммобилизованные ферменты – ферменты, связанные с нерастворимым носителем при сохранении каталитической активности фермента.

С помощью энзиматического синтеза получают: β -лактамы антибиотики, аминокислоты, бутанол, гидролизированные высокомолекулярные соединения; ферменты применяют как биологические детергенты, при производстве сыров, для переработки крахмала, производства кожи, в шелкоткацком производстве.

г) **Промышленная биотехнология** – включает получение веществ, используемых в легкой и тяжелой промышленности (этанола, бутанола, этилена, ацетона, уксусных ангидридов, биопластика) и производство альтернативных источников энергии и биогеотехнологии.

Биогеотехнология – это приложение биотехнологических приемов и методов к добыче, обогащению и переработке руд, отделению и концентрированию металлов из сточных вод как вторичного сырья, экстракции остаточных порций нефти из иссекающих месторождений.

Методы биогеотехнологии используются для извлечения широкого круга ценных металлов: Cu, U, Mn, Au, Ag, Pt, Zn, Ni, Sn, Cd и др.

Энергетика.

Потенциальным источником энергии является биомасса зеленых растений. Объясняется это тем, что только 2% ее используется на корм животным и пищу человека. Значительная доля энергетического потенциала растительной биомассы используется путем непосредственного сжигания. При этом реализуется только 10% энергозапасов и происходит загрязнение окружающей среды дымом и накопление углекислого газа.

Наиболее распространенными видами **альтернативной энергии** является энергия воды, ветра и солнца, а также этанол, метан и водород, получаемые за счет переработки микроорганизмами отходов промышленности и сельского хозяйства. *При этом создается возможность реализовывать от 50 до 80% потенциальной энергии, нет загрязнения атмосферы и практически каких-либо отходов, которые используются как высококачественное удобрение.*

д) **Охрана окружающей среды** – или экологическая биотехнология.

Выделяют 3 направления:

1. **очистка сточных вод** – основными загрязнителями природных водоемов являются продукты химического производства. *Они содержат различные синтетические соединения, разложение которых в природе протекает очень медленно. Многие из этих соединений токсичны для организма человека и животных. Особенно опасны ксенобиотики, имеющие циклическую структуру и обладающие высокой реакционной способностью.* Использование микроорганизмов для очистки сточных вод обусловлено тем, что они обладают большим разнообразием и высокой специфичностью метаболизма. Это обуславливает возможность микроорганизмов участвовать в деградации, трансформации и детоксикации веществ.

2. **очистка атмосферного воздуха** с помощью микроорганизмов (они активно усваивают аммиак, окисляют сероводород, диметилсульфоксид и др.) и растений.

В настоящее время установлено, что растения обладают способностью с различной интенсивностью поглощать из почвы и воздуха и перерабатывать многие химические соединения, например: окиси азота, аммиак, метан, пропан, бензол, толуол, ацетон и др.

Для реализации их очищающего действия используют структурированные посадки растений, которые называются «зеленым фильтром» (однолетние растения, кустарники, многолетние растения) вокруг промышленных объектов.

3. **Биоремедиация (восстановление) земель** – основные инструменты – растения и микроорганизмы. Известно, что высшие растения имеют так называемую эпифитную микрофлору, отдельные представители которой, вторгаясь в сложившийся биоценоз, функционируют как деструкторы.

2. Тканевая инженерия: основные стратегии получения новых тканей. Достоинства/недостатки.

Существует 3 основных стратегии получения новых тканей:

1. Самосборка. Этот подход заключается в прямой имплантации изолированных клеток, которые затем синтезируют свой матрикс. К ограничениям подхода можно отнести возможную неспособность клеток поддерживать свои функции в реципиенте и иммунологическое отторжение. В некоторых случаях такие клетки синтезируют матрикс еще в культуре *In vitro*, образуя пласты и формируя многослойные структуры, дающие заменитель кожи или кровеносных сосудов. Однако хорошо известно, что для многих типов клеток для нормального функционирования необходимо прикрепление к субстрату, и их прямая пересадка без носителя приводит к их смерти или потере функции.

2. Бесклеточный каркас. Этот подход, основанный на прямой имплантации биоматериалов и рассчитанный на прорастание клеток окружающих тканей в пористый материал, называется **тканевой индукцией**. Часто в матрицу загружают факторы роста и другие лечебные агенты. Плюс этого подхода в отсутствии необходимости источника клеток. Свойства материала носителя могут улучшать прикрепление, миграцию и распределение клеток, ответственных за реакцию ткани. Хорошо работает для кости.

3. Заселение клеток в полимерные носители. При этом подходе временная синтетическая структура выполняет роль субстрата для прикрепления имплантируемых клеток и физически поддерживает образующуюся новую ткань. Пересаживаемые клетки прикрепляются к носителю, размножаются, секретируют новый матрикс и стимулируют тканеобразование. За это время носитель постепенно разлагается и совсем исчезает.

Клеточная компонента отвечает за генерацию новой ткани, синтезируя внеклеточный матрикс (ВКМ), являющийся залогом синтеза здоровой функциональной ткани. Материал носителя изначально обеспечивает механическую стабильность и служит образцом для трехмерного роста клеток. Взаимодействие этих двух компонент, в частности координация между скоростью разрушения полимера и роста клеток, является принципиально важным для успешной реконструкции тканей.

3. Типы клеток/клеточных линий, используемых для биопечати, особенности подготовки клеточного материала к процессу 3 D печати. Ограничения метода.

Клетки, используемые в тканевой инженерии, можно получать из **различных источников**, включая первичные ткани и клеточные линии.

В зависимости от методики первичной эксплантации ткани и техники ее культивирования различают **монослойные**, и **суспензионные культуры** растущих клеток.

В монослойных культурах клетки растут и развиваются на поверхности стекла или пластика (бутылок, матриц, флаконы, матрасы) или поверхности специальных носителей, погруженных в питательной среде. Культура клеток выращивается в виде **монослоя**, в виде однослойной **стационарной культуры**.

В суспензионных культурах клетки растут свободно (подобно микроорганизмам) в суспензии. Используя культивирование клеток в суспензии, можно получить большой выход клеток на единицу объема среды при обильной подаче питательных веществ. Однако к такому типу культивирования удовлетворительно адаптируются не все клетки, часто только трансформированные (такие как Hela, ВИК-21 и др.) или культуры из клеток крови (лейкоцитарные культуры).

Достоинства монослойных культур: 1. Легко провести полную замену среды и промыть клетки перед добавлением свежей питательной среды.

2. Позволяют обеспечить высокую плотность клеток.

3. У многих клеток экспрессия требуемого продукта идет эффективнее, если клетки прикреплены к субстрату.

Недостатки монослойных культур:

1. требования большого пространства;
2. возрастание стоимости и трудоемкости при увеличении масштаба;
3. недостаточно эффективный контроль, обусловленный трудностями отбора пробы;
4. сложности в определении и контроле рН, концентрации кислорода.

Различают два основных вида монослойных клеточных культур: **первичные и перевиваемые**.

Первичная клеточная культура – это культура, полученная непосредственно из тканей человека или животных в эмбриональном или постнатальном периоде. Эмбриональные клетки обладают выраженной пролиферативной активностью вне организма и характеризуются стабильностью генома.

Срок жизни таких культур ограничен. По прошествии определенного времени (обычно 20-30 пересевов. Пересев называют субкультивированием клеток) в них возникают явления неспецифической дегенерации, что выражается в грануляции и вакуолизации цитоплазмы, округлении клеток, утрате связи между клетками и твердым субстратом, на котором они выращивались. Вероятно, этот процесс связан с естественным угасанием метаболической активности клеток, выведенных из-под контроля нейрогуморальных факторов, действующих в целостном организме.

Перевиваемые клеточные культуры получают из отдельных клеток первичных культур, которые на фоне дегенерации большей части клеточного пласта сохраняют способность к росту и размножению. Такие клетки могут расти неограниченно долго.

Другим источником перевиваемых клеточных линий являются **злокачественные новообразования**. В этом случае трансформация клеток происходит *in vivo* в результате развития патологического процесса, этиология которого во многом остается еще невыясненной.

Не все злокачественные новообразования способны давать начало перевиваемым клеточным культурам. Например, невозможно получить перевиваемые клетки из раковых опухолей желудка и молочных желез человека, но сравнительно легко выводятся линии из тканей сарком и злокачественных опухолей нервной системы.

Различают **линии и штаммы** перевиваемых клеток.

Клеточные штаммы — это клетки с диплоидным набором хромосом и ограниченной продолжительностью жизни *in vitro* (полуперевиваемые, до 100 пересевов). **Клеточные линии** – это перевиваемые клетки, характеризующиеся потенциальным бессмертием и, как правило, гетероплоидным кариотипом.

Основное преимущество линий перевиваемых клеток, по сравнению с любой первичной культурой, состоит в потенциальной неограниченности размножения вне организма и относительной автономности, сближающей их с бактериями и одноклеточными простейшими.

Совокупность изменений, приводящих к появлению у клеток способности к неограниченному росту и размножению, называют **трансформацией**, а клетки перевиваемых тканевых культур — **трансформированными**.

4. Каркасы для биоинженерии (основные требования к материалу носителя, подходящего для тканевой инженерии; краткая характеристика:

компонентов внеклеточного матрикса, природных полимеров, синтетических полимеров как каркасов для органов человека).

Внеклеточный матрикс – это композитная субстанция, состоящая из разнообразных макромолекул, которые можно разделить на 4 основных класса, каждый из которых отвечает за специфические характеристики. Это коллагены, протеогликаны, гликопротеины межклеточного взаимодействия и эластические волокна. Организация, форма и механические свойства матрикса в различных тканях могут сильно различаться в зависимости от химического состава и трехмерной организации присутствующих специфических компонент.

Коллагены – самые широко распространенные белки в организме, и в основном играют структурную роль.

Протеогликаны – сложные макромолекулы, каждая из которых состоит из сердцевинного белка с одним или несколькими ковалентно присоединенными линейными полисахаридными цепями – глюкозаминогликанами. Протеогликаны, например гиалуроновая кислота, встречаются, как в клетке, так и на ее поверхности. Этимолекулы способны ассоциировать между собой, образуя запутанные сетки, удерживающие большое количество воды, обладающие упругостью и в то же время легко деформируемые. Благодаря своим упругим свойствам, протеогликаны организуют пространство, в котором клетки могут двигаться, проходить дифференцировку, а также создавать новый матрикс.

Гликопротеины межклеточного взаимодействия – белки, содержащие специфические последовательности аминокислот, узнаваемые рецепторами на поверхности клеток. Эти полипептидные последовательности часто выступают в роли сигналов узнавания сайтов адгезии и могут обеспечивать специфичность для данного типа клеток. Адгезия клеток является ключевым фактором в организации клеток в ткани и поддержания целостности ткани. Клеточная адгезия обычно реализуется за счет рецепторов, таких как интегрины, отвечающих на сигналы узнавания.

Эластические волокна придают системе гибкость.

Полимерные матрицы, имитирующие внеклеточный матрикс, разрабатывают для того, чтобы контролировать и направлять регенерацию тканей, вызывать специфические клеточные взаимодействия и реакции. Кроме того, они служат в качестве носителей, поддерживающих клетки при трансплантации.

Основные виды искусственных носителей

1. Первые искусственные матрицы были созданы на основе **коллагена**. Коллаген может быть приготовлен в виде раствора или сформирован в нити, губки или гидрогели. Несмотря на то, что его получают из чужеродных источников, использование методов очистки позволяет почти избежать иммунного ответа. Прикрепление клеток к коллагену происходит за счет белков интегринов, узнающих определенный мотив Arg-Gly-Asp (RGD) последовательность. Прикрепление к этому естественному субстрату и связанные с ним сигналы внутри клетки приводят к улучшению метаболизма клетки, пролиферации, долгожительству и сохранению дифференцированного состояния. Бесклеточные матрицы получают путем комбинированной ферментативной и детергентной обработки тканей, богатых коллагеном, таких как сердечные клапаны свиньи или подслизистой тонкого кишечника (SIS). Обработка убирает все клетки и потенциально антигенные белки, остается только коллаген и эластин с небольшим количеством ассоциированных полисахаридов внеклеточного матрикса.

Недостатком конструкций на основе коллагена является низкая механической прочности и быстрая биodeградация. Это можно компенсировать за счет сшивок, например, при помощи глутарового альдегида.

2. Гиалуроновая кислота – один из основных компонентов внеклеточного матрикса, специфично связывает белки матрикса и белки на поверхности клеток. Гиалуронан оказывает стимулирующий эффект на секрецию матрикса хондроцитами. Уже с 1999 года в клиниках Европы для лечения сквозных костно-хрящевых повреждений применяется коммерчески доступный тканеинженерный заместитель, Hyalograft C, состоящий из аутологичных хондроцитов, высеянных на предварительно сформированный нетканый носитель из гиалуроновой кислоты.

3. Альгинаты – это полисахариды, получаемые из морских водорослей и принадлежащие к семейству линейных сополимеров маннуровой и гулуриновой кислот. При добавлении к ним двухвалентных катионов, например кальция, альгинаты образуют нерастворимый гидрогель. За гелеобразование в альгинатах отвечают ионные взаимодействия, поэтому оно полностью обратимо при хелатировании двухвалентного катиона, используемого для получения геля. Недавно альгинаты начали использовать в качестве материала для пересадки клеток различных типов, включая хондроциты. Из альгинатов делают и капсулы для пересадки клеток поджелудочной железы.

К плюсам альгинатных гидрогелей относятся нетоксичность, простота в обращении и минимальная воспалительная реакция со стороны организма.

Как и у большинства гидрогелей, их механическая жесткость достаточна для задач, в которых не требуется приложение большой нагрузки, или для имплантации после культивирования *in vitro* и *in vivo* в течение нескольких недель, но в средах с большими напряжениями, например несущих нагрузку суставах их изначальная хрупкость представляет проблему.

4. Первыми синтетическими биоразлагаемыми полимерными носителями, предназначенными для высева клеток и регенерации тканей, стали представители семейства **поли(α -гидроксикислот)**, таких как поли(молочная кислота) (ПМК), или полилактат, поли(гликолиевая кислота) (ПГК) и сополимер поли(молочная-со- гликолиевая кислота) (ПМГК). Такие материалы имеют высокую прочность на растяжение и небольшое относительное удлинение, у них высокий модуль упругости, что делает их более подходящими для случаев, требующих приложения нагрузки –хирургических нитей и фиксаторов. Однако эти материалы медленно разлагаются и при нахождении в теле более 12 недель вызывают воспалительную реакцию. Это происходит в результате высвобождения кислых продуктов распада, таких как молочная и гликолиевая кислоты.

5. Синтетические самоорганизующиеся пептиды нового типа самопроизвольно образуют гидрогели в ответ на изменения pH и/или ионной силы. Для структуры пептидов такого типа характерна самокомплиментарная структура, состоящая из регулярно повторяющихся единиц, образованных положительно и отрицательно заряженными остатками, между которыми находятся гидрофобные остатки. Такие пептиды самоорганизуются при специфических значениях pH и ионной силы, образуя β -складки, которые затем агрегируют с образованием гидрогеля, состоящего из переплетенных нанофибрил. Уникальным свойством этих гидрогелей является их фибриллярная микроструктура, масштаб которой примерно на три порядка мельче, чем у полимерных гидрогелей. Разнообразие возможностей создания пептидных гидрогелей почти не ограничены, поскольку можно варьировать последовательность и состав входящих в него пептидов. В пептид можно легко встроить функциональный домен, например последовательность клеточной адгезии RGD.

5. Применение тканевой инженерии в биомедицине (трансплантация органов, раневые повязки, гидрогели для заживления ран, искусственная кожа).

Особенности реконструирования тканей на примере кожи

Кожа стала первым искусственно полученным органом, получившим разрешение на клинические испытания. Кожа состоит из двух слоев. Первый, эпидермис, состоит в основном из кератиноцитов, которые постоянно делятся и заменяют друг друга. В эпидермисе также присутствуют меланоциты, распределяющие меланин, защищающий эпидермис от ультрафиолетового излучения. Второй, расположенный глубже слой, дерма, богат соединительной тканью и обеспечивает сопротивление растяжению и гибкость. Там же расположена сосудистая сеть, лимфатическая система, нервные пучки и другие дополнительные структуры кожи. В дерме относительно мало клеток, основной объем занят внеклеточным матриксом, состоящим из переплетенных коллагеновых фибрилл, протеогликанов и гликопротеинов. Основным типом клеток дермы – фибробласты, отвечающие за выработку и поддержание большей части матрикса.

При повреждении кожи, если рана пересекает только часть дермы, дерма способна заставить клетки заниматься собственной реконструкцией. Более того, на помощь дерме приходят глубинные придатки кожи, такие как волосяные фолликулы и потовые железы, которые могут стать источниками эпидермальных клеток. Однако если рана затрагивает всю дерму, как это бывает при сквозных ожогах или кожных язвах, источников клеток для регенерации нет. Это послужило толчком к созданию искусственных эквивалентов кожи.

Для разработки гибридного заменителя кожи, который бы хорошо поддерживал структуру, использовали вязанные сетки из сополимера L-лактид-гликолид (PLGA) с фиксированным размером петли, на которые затем наносили раствор смеси коллаген-хитозана (CCS) и подвергали лиофильной сушке (PLGA_m/CCS). После имплантации PLGA_m/CCS и не сжимается и способствует инфильтрации клеток, образованию новой ткани, прорастанию сосудов.

Один из методов реконструкции подразумевает высевание аутогенных эпидермальных кератиноцитов на поверхность раны. Доктор Jorg Gerlach с коллегами изобрели устройство для пересадки кожи Skin Gun, которое распыляет на поврежденную кожу пострадавшего раствор с его же стволовыми клетками. На данный момент новый метод лечения находится на экспериментальной стадии, но результаты уже впечатляют: тяжелые ожоги заживают буквально за пару дней.

6. Биопротезы: краткая характеристика, особенности конструирования, достоинства/недостатки, ограничение метода.

Создание новых классов биопротезов напрямую связано с развитием микроэлектроники, медицины, нейрофизиологии, в настоящее время является одной из приоритетных задач модернизации отечественного здравоохранения. На сегодняшний день современный бионический протез представляет собой электронно-механическое устройство, большая часть которого создается из пластика. Основными компонентами конструкции таких протезов являются каркас, механика и система управления.

Для создания каркаса широко используются поливинилхлориды, стеклопластики, жесткие и эластичные пенопласты, а также легкие металлические сплавы, благодаря чему обеспечиваются прочность и долговечность протеза. Существует множество видов пластика, которые обладают различной температурой плавления, повышенной прочностью или эластичностью и другими важными в протезировании факторами.

Другая функция каркаса – защита электронных систем от различных повреждений. Под каркасом находится аккумулятор, в зависимости от емкости которого заряда хватает на период от 3 до 7 дней. Протезы покрывают силиконовой или резиновой оболочкой для повышения эстетических качеств.

Для повышения удобства использования протеза и улучшения его мобильности применяют механические системы. Бионический протез имеет встроенные механизмы, которые делают устройство подвижным. Например, в искусственных ногах используются гидравлические, пружинные или даже пневматические амортизаторы, обеспечивающие смягчение и распределение ударной нагрузки при движении.

Для контроля над протезом в нем устанавливают датчики нервных сигналов и обрабатывающий процессор, который осуществляет управление приводами. Такая сложная сеть датчиков, интегрированная в модуль, регистрирует изменения и позволяет вносить коррективы в свою работу, составляя систему управления протезом. Сегодня искусственные конечности уже имеют возможность программироваться так, чтобы принимать собственные решения с использованием камер и алгоритмов, однако о широком применении заявлять пока рано.

Для некоторых моделей ученые смогли разработать искусственный заменитель кожи, снабженный подобием рецепторов, благодаря которым протез способен «ощущать» прикосновения, определять их силу и передавать информацию к нервной системе. Такое усовершенствование позволило пациентам вновь испытывать проприоцептивные и тактильные ощущения.

До недавнего времени протезы крепились к телу пациента механически и не имели никакой связи с нервной системой. Любое движение в шарнирах-суставах требовало больших усилий, так как для его выполнения владельцу нужно было тем или иным образом регулировать поведение своего протеза, вручную обеспечивая обратную связь, совершая нефизиологичные движения мышц, что в свою очередь ограничивало набор выполнимых команд, поэтому мелкая моторика была практически невозможна. Теперь протезы рук обладают различным набором движений для повседневных задач, набором вариантов захвата и сжатия предметов. Управлять режимами работы данных протезов возможно посредством регистрации биопотенциалов нервных волокон, располагающихся в сохранившихся группах мышц конечностей, или же напрямую, считывания изменения электрических сигналов от головного мозга, а также при помощи специальной панели управления. При желании пошевелить конечностью определенным образом возникает нервный импульс, который приводит к изменению электрического биопотенциала мышцы, что в свою очередь улавливается датчиками прибора.

Благодаря нейрофизиологическому принципу работы бионического протеза появилась возможность значительно упростить управление, а также частично вернуть пациенту ощущение обладания полноценной конечностью. При помощи бионических протезов человеку намного проще справляться с различными бытовыми действиями: пользоваться столовыми приборами, писать, работать за компьютером, завязывать шнурки, открывать бутылки, гладить белье, одеваться и многое другое.

Усовершенствование способов ампутации и развитие протезирования позволяют сократить сроки реабилитации людей. Ранняя ходьба на высокотехнологичном протезе позволяет больному быстрее адаптироваться к новым условиям жизни, а также способствует формированию нового двигательного стереотипа, оказывает положительное влияние на психическое состояние больного.

Как и ранее, биопротезы несут эстетическую функцию. Они устроены так, что при установке требуется минимальное инвазивное вмешательство и как следствие –

незначительное количество инородных материалов в суставе, что также обеспечивает малую болезненность.

Более совершенная конструкция не требует дополнительных ремней для крепления, поэтому сосуды не сдавливаются и не нарушается трофика тканей культи, что обеспечивает их нормальную жизнедеятельность.

В основе управления биопротезов заложены принципы работы здоровой конечности, в чем заключается их физиологичность. Такое управление не требует от инвалида неестественных компенсаторных движений для осуществления захвата предмета.

Недостатки биопротезов

К сожалению, имеющиеся модели рук и ног не способны развивать значительных усилий, а также работают недостаточно свободно и точно. Решить эту проблему можно за счет технологии искусственных мышц на основе углеродных трубок. Результаты многочисленных исследований показывают, что физические свойства материалов, изготовленных с применением нанотрубок, состоящих из атомов углерода, могут оказаться очень полезными в создании высокотехнологичных протезов. Благодаря уникальной структуре по своей работе они способны превосходить живые мышцы, а их способность чувствовать малейшие изменения давления позволяет использовать их в качестве переключателей в компьютерных чипах и микросхемах.

Однако существует другая не менее значимая проблема: в протезах из-за опосредованности и «зашумленности» передаваемого сигнала наблюдается задержка в их работе, что ограничивает использование протезов в тех случаях, когда важна скорость реакции (например, при управлении транспортом). Для решения данной проблемы предлагается имплантировать датчики непосредственно в двигательные центры коры головного мозга.

В 2013 г. практически все части протеза были распечатаны на 3D-принтере, но и это не позволило сделать протезы доступными для всех, хотя существенно снизило их стоимость. Наибольшее предпочтение сейчас отдается протезам, изготовленным с использованием сверхлегких материалов, таких как углепластик, титановые и алюминиевые сплавы.

7. Современные теории канцерогенеза (мутационная, эпигенетическая, хромосомная, вирусная, иммунная).

Мутационная теория онкогенеза

Канцерогенез определяют как преобразование здоровых клеток в клетки, способные к автономному росту, инвазии в окружающую ткань и метастазированию. Рак относится к полиэтиологическим заболеваниям, т.е. нет определенного фактора, однозначно вызывающего развитие опухолевого процесса.

На сегодняшний день в современной онкологии выделяют несколько теорий канцерогенеза, но основной и общепринятой является мутационная теория.

Прямым доказательством мутационной природы рака можно считать открытие протоонкогенов и генов-супрессоров, изменение структуры и экспрессии которых за счёт различных мутационных событий, в том числе и точечных мутаций, приводит к злокачественной трансформации.

Открытие клеточных протоонкогенов впервые было осуществлено с помощью высокоонкогенных РНК-содержащих вирусов (ретровирусов), несущих в составе своего генома трансформирующие гены. Молекулярно-биологическими методами было установлено, что ДНК нормальных клеток различных видов эукариот содержит

последовательности, гомологичные вирусным онкогенам, которые получили название протоонкогенов. Превращение клеточных протоонкогенов в онкогены может происходить в результате мутаций кодирующей последовательности протоонкогена, что приведет к образованию изменённого белкового продукта, или в результате повышения уровня экспрессии протоонкогена, вследствие чего в клетке увеличивается количество белка. Протоонкогены, являясь нормальными клеточными генами, обладают высокой эволюционной консервативностью, что указывает на их участие в жизненно важных клеточных функциях.

Антионкогены, или гены-супрессоры опухолей, — это гены, белковые продукты которых подавляют образование опухоли. В 80–90-х годах XX века обнаружены клеточные гены, осуществляющие негативный контроль клеточной пролиферации, то есть препятствующие вступлению клеток в деление и выходу из дифференцированного состояния. Утрата функции этих антионкогенов вызывает неконтролируемую клеточную пролиферацию. Благодаря своему противоположному по отношению к онкогенам функциональному назначению они были названы антионкогенами или генами-супрессорами злокачественности. В отличие от онкогенов, мутантные аллели генов-супрессоров рецессивны. Присутствие одного мутантного аллеля, при условии, что второй нормален, не приводит к снятию ингибирования образования опухоли.

Таким образом, протоонкогены и гены-супрессоры образуют сложную систему позитивно-негативного контроля клеточной пролиферации и дифференцировки, а злокачественная трансформация реализуется через нарушение этой системы.

Для преобразования повреждения ДНК в наследуемое изменение молекулы необходима репликация ДНК и последующее деление клетки. Таким образом, пролиферация становится важным фактором в формировании мутаций и в создании клонов клеток, несущих эти мутации. Злокачественные клетки должны накопить несколько мутаций в соответствующих генах, которые обеспечат автономную репликацию и инвазию. Однако мутация в специфическом генетическом локусе — довольно редкий случай (в специфических участках генома составляет 10⁻⁶). Частота мутаций в стволовых клетках человека в обычных условиях еще ниже и составляет 10⁻¹⁰ на одно деление клетки. Однако у взрослого человека, как предполагается, содержится много мутировавших клеток вследствие большого количества пролиферирующих стволовых клеток. Практически, клетки, несущие начальную мутацию, называемые иницирующие клетки, должны создать клон из нескольких миллионов клеток. В этом клоне вероятность второй мутации в соответствующем гене у одной клетки снова нарастает. Возникновение новой мутации в соответствующем клоне иницирующих клеток требует появления нового клона клетки с двумя мутациями и т.д., пока не будет накоплено достаточное количество мутаций для возникновения автономно делящихся клеток. Этот процесс клинически проявляется как прогрессия болезни и характеризуется увеличением скорости роста, появлением способности вторжения в соседнюю ткань и метастазирования, ангиогенеза и постепенного развития устойчивости к при меняемым химиотерапевтическим средствам.

Вирусная теория онкогенеза

Обнаружение вирусов в целом ряде злокачественных опухолей, таких как, саркома Капоши, рак шейки матки, рак печени и др. позволило Л.А. Зильберу в 1945 году сформулировать теорию вирусной природы рака. Основным постулатом этой теории является утверждение о том, что геном клетки может нарушаться вследствие активации интегрированной в него ДНК вируса.

Согласно вирусной теории рака, геном опухолевого вируса интегрируется в геном нормальной клетки, что вызывает её бесконтрольное деление. Геном вируса,

встроенного в ДНК клеток хозяина, был назван провирусом. В 70-е годы 20-го столетия в некоторых РНК-содержащих вирусах были обнаружены гены, необходимые для превращения нормальной клетки в опухолевую. Эти гены были названы онкогенами или трансформирующими генами вирусов - v-опс. В дальнейшем копии или аналоги вирусных онкогенов были найдены в геномах нормальных клеток человека и животных, а также была экспериментально доказана способность онкогенов клеток теплокровных встраиваться в геном вируса. В настоящее время большинство онкогенов идентифицировано, установлена их химическая структура, локализация в хромосомах, а также выявлены белки - продукты активности этих генов (табл. 3).

Обнаружено несколько типов вирусов вызывающих возникновение злокачественных опухолей у человека. Среди них вирус папилломы человека (провоцирует развитие рака шейки матки), вирус гепатита В (приводит к гепатоцеллюлярному раку печени), вирус иммунодефицита человека (причина развития саркомы Капоши), вирус Т-клеточного лейкоза человека - ATL V (adult T-cell leukemia virus), вирус Эпштейна-Барра из группы вирусов герпеса, являющийся весьма вероятным этиологическим фактором лимфомы Беркитта и некоторые другие.

Первый онкоген был открыт в 1978 г., его назвали src от слова "саркома". Этот проонкоген кодирует фермент протеинкиназу Src, повышение активности которой превращает нормальные клетки в раковые. Однако при изучении гена src было обнаружено, что этот ген не играет никакой роли в жизни тех вирусов, которые его содержат, но тогда откуда в вирусах взялся ненужный им ген? Оказалось, что ген src не заносится в геном клеток вирусами, а всегда присутствует в клетках человека. Однако в норме этот ген находится в "молчащем" состоянии, т.е. на нем не синтезируется мРНК и не производится белок. Но если этот ген внесен вирусом, то он начинает работать. Было показано, что включение гена src в геном вируса меняет регуляцию работы этого гена. В геноме вируса перед геном src оказывается очень активный вирусный промотор (последовательность нуклеотидов в ДНК, узнаваемая РНК-полимеразой, начало транскрипции), наличие которого и делает ген src онкогеном. После встраивания его в таком виде в геном нормальной клетки онкоген начинает активно работать, что приводит к синтезу фермента (рис. 7). Необходимые промоторные участки содержатся в больших терминальных повторах ДНК-копий РНК-содержащих вирусов. В роли активатора структурных генов могут выступать мобильные генетические элементы, способные перемещаться по геному и встраиваться в различные его участки. Они называются транспозирующими элементами генома или энхансерами (enchancer - усилитель). Энхансеры активируют транскрипцию структурного гена, зачастую находясь на расстоянии многих тысяч пар нуклеотидов от него, а иногда они могут быть встроены в хромосому после гена. Подобный образом, например, активируется и затем транскрибируется ген тус.

Помимо src в последние годы было обнаружено ещё несколько десятков подобных онкогенов, которые присутствуют в геноме нормальных клеток позвоночных и играют важную роль во время эмбрионального развития, когда необходимо частое деление клеток. По мере развития организма работа этих генов блокируется регуляторными системами клеток. Но когда эти гены начинают активно работать в клетках взрослого организма, происходит значительный рост пролиферации этих клеток и как следствие развитие опухоли.

Эпигенетическая теория онкогенеза

Изучение эпигенетических механизмов онкогенеза – активно развивающаяся в последние годы область научных исследований. Эпигенетика (от греч. *επί*-над, выше, внешний и генетика) изучает закономерности изменения экспрессии генов и фенотипа

клетки, вызванные механизмами, не затрагивающими генетическую информацию, заключающуюся в последовательности нуклеотидов в ДНК. Основными эпигенетическими процессами являются: Метилирование ДНК. Процесс метилирования ДНК заключается в присоединении метильной группы к цитозину. Обычно это происходит в динуклеотидных группах цитозин-гуанозин: CpG, где p – фосфатная группа, связывающая эти нуклеотиды (рис 5). Рисунок 5. Выключение» генов осуществляется при помощи метилирования цитозиновых оснований ДНК, прикрепления к ним метильной группы -CH₃. Метилирование цитозина в парах CpG, находящихся в промоторах генов (регуляторных участках), препятствует транскрипции гена, т.е. реализации генетической информации, а деметилирование, наоборот, способствует экспрессии генов. Установлено, что даже незначительные изменения в уровне метилирования ДНК могут существенно влиять на уровень генетической экспрессии. При этом метильная группа выполняет роль «предохранителя». Чем меньше метильных групп в промоторах генов, тем более клетка дифференцирована. Чем выше степень метилирования ДНК, тем ниже степень дифференцировки. Гиперметилирование промоторных областей может подавлять экспрессию генов-супрессоров опухолевого роста, а деметилирование – активировать экспрессию онкогенов. Повышение уровня метилирования генов-супрессоров опухолевого роста в раковых тканях в сопоставлении с нормальными клетками иногда достигает 100%. Доказано, что развитие онкопатологии может быть остановлено при изменении метилирования определенных генетических сайтов в раковых клетках. Определение специфических профилей метилирования в ряде случаев позволяет прогнозировать развитие рака. Глобальное деметилирование ДНК обычно связывают с хромосомной нестабильностью раковых клеток. Однако в них одновременно может наблюдаться гиперметилирование определенных промоторов генов-супрессоров рака. Модификации гистонов. Гистоны - белки, упаковывающие ДНК в нуклеосомы, из которых формируется ядерный хроматин. Из них гистоны H2A, H2B, H3 и H4 образуют сердцевину нуклеосомы, на которую наматывается ДНК, а гистон H1 связывает нуклеосомы между собой. N-концевые хвосты гистонов могут подвергаться посттрансляционной модификации: ацетилированию, метилированию, фосфорилированию и др. (рис 6). Ацетилирование гистонов приводит к разрыхлению хроматина, и, соответственно, облегчению транскрипции, повышению экспрессии генов и активации синтеза соответствующих белков. Напротив, их деацетилирование связано со снижением транскрипционной активности. Известно, что у раковых клеток снижен уровень ацетилирования гистона H4 по лизину в положении 16 (K16-H4). Уровень ацетилирования лизина 9 в гистоне H3 (K9-H3) изменяется при развитии карцином легких, лимфом и сарком мягких тканей мышей, а также при раке легких, простаты и лейкемии у людей. Уровень триметилирования лизина 20 в гистоне H4 (K20-H4) в раковых клетках обычно снижен.

Регуляция генов на уровне РНК (siРНК, микроРНК). В последнее время большое внимание специалистов привлечено к изучению роли малых интерферирующих РНК (siRNA) в регуляции генетической активности. Интерферирующие РНК могут изменять стабильность и трансляцию мРНК путем моделирования функций полирибосом (несколько рибосом, одновременно транслирующих одну молекулу РНК) и структуры хроматина.

Иммунная теория онкогенеза

Согласно иммунной теории, первопричиной рака является не столько возникновение мутантных клеток, сколько нарушение защитных механизмов организма по их обнаружению и разрушению. Известно, что, несмотря на значительное количество мутантных клеток, которые постоянно образуются в организме здорового человека,

опухоль развивается далеко не всегда. Кроме того, большая частота возникновения опухолей наблюдается у пациентов, получающих препараты, подавляющие иммунитет, или в случае иммунодефицитов, вызванных другими факторами, например действием канцерогенов или вследствие наследственных нарушений отдельных звеньев иммунной системы. На основании этой теории можно объяснить, почему с возрастом риск развития рака прогрессивно повышается. На фоне возрастного увеличения частоты мутаций, по причине возникающих дефектов в системе репарации ДНК, наблюдается снижение иммунной реактивности.

Хромосомная теория онкогенеза

В 1999 г. Питер Дюсберг из Калифорнийского университета в Беркли создал теорию, согласно которой рак является следствием исключительно анеуплоидии, а мутации в специфических генах не играют значимой роли в канцерогенезе. Термин «анеуплоидия» использовался для описания изменений, вследствие которых клетки содержат число хромосом, не кратное основному набору, но в последнее время его стали применять в более широком смысле. Теперь под анеуплоидией понимают также укорочение и удлинение хромосом, перемещение их крупных участков (транслокации). Большинство анеуплоидных клеток сразу же погибают, но у немногих выживших тысячи генов оказываются не такими, как у нормальных клеток. Сложенная совокупность ферментов, обеспечивающих синтез ДНК и её целостность, распадается, в двойной спирали появляются разрывы, ещё больше дестабилизирующие геном. Чем выше степень анеуплоидии, тем менее стабильна клетка и тем больше вероятность того, что, в конце концов, появится клетка, способная расти где угодно. В отличие от трех предыдущих теорий, гипотеза изначальной анеуплоидии полагает, что зарождение и рост опухоли в большей степени связаны с ошибками в распределении хромосом, чем с возникновением в них мутаций. Впервые характерные для опухолей изменения кариотипа (набора хромосом определенной структуры, специфической для данного организма) были обнаружены в клетках хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ) - рака крови, обусловленного неконтролируемым делением клеток в костном мозге. В этих клетках в результате переноса длинного плеча хромосомы 22 на длинное плечо хромосомы 9 появляется так называемая филадельфийская (Ph') хромосома. Ph'- хромосома, как и многие другие хромосомные маркеры, не связанные с мутацией в половых клетках, является приобретенным, а не наследуемым признаком. В последние полтора десятилетия благодаря новым методам приготовления и дифференциальной окраски хромосомных препаратов, позволяющих идентифицировать каждую хромосому в отдельности, специфические изменения кариотипа выявлены в клетках некоторых опухолей человека, главным образом, гемобластозов. При остром миелобластном лейкозе (ОМЛ) происходит транслокация (перемещение) части хромосомы 8 на хромосому 21, или транслокация с 6-й на 9-ю хромосому. Специфические хромосомные изменения обнаружены при острых промиелоцитарном, монобластном и лимфобластном лейкозах, лимфоме Беркитта и т. д. Некоторые специфические нарушения хромосом в костномозговых клетках, отсутствующие в период установления диагноза, появляются в поздние стадии заболевания, т. е. в ходе прогрессии опухоли, например транслокации между 6-й и 9-й хромосомами при ХМЛ. Однако, для ряда опухолей анеуплоидия не характерна.

8. Стадии канцерогенеза. Метастазы – механизм возникновения, роль нейтрофильных экстраклеточных ловушек.

Стадии канцерогенеза

Выделяют четыре стадии канцерогенеза:

1 стадия – стадия инициации. Первичное воздействие канцерогенных факторов на клетку приводит к возникновению трансформирующего изменения протоонкогенов, т.е. генов, кодирующих белки способные стимулировать образование опухоли, а также выключению генов-супрессоров опухоли (антионкогенов). При этом внутриклеточные сигнальные каскады устроены таким образом, что нарушение лишь одного из звеньев вызывает апоптотическую смерть клетки, прерывая процесс бесконтрольного деления. Для успешного канцерогенеза необходимо изменение многих звеньев, нескольких белков, нескольких генов, максимально имитирующих влияние цитокинов (гормоноподобных соединений, выполняющих регуляторные функции) и способных устранить возможную гибель клетки.

2 стадия – стадия промоции. В стадии промоции происходит изменения экспрессии ряда сигнальных белков на фоне повторного воздействия на клетку или канцерогенного фактора (того же, что вызвал инициацию, или другого), или фактора, не являющегося канцерогеном, но способного активировать изменённые онкогены, так называемого промотора. Как правило, промоторы вызывают пролиферацию клеток посредством активации пролиферативных сигнальных каскадов, с участием, например, протеинкиназы C. Иницированная клетка приобретает определенные фенотипические свойства только при условии относительно длительного повторного активирующего действия промоторов, что и приводит к необратимой злокачественной трансформации клетки. При этом трансформированные клетки должны приобрести способность обходить иммунный контроль организма «хозяина».

3 стадия – стадия дедифференцировки. Накопление «несанкционированных» сигнальных белков является хотя и необходимым, но не достаточным условием образования опухоли. Опухолевый рост становится возможным лишь после приобретения способности уклонения трансформированных клеток от дальнейшей дифференцировки. Прекращение дифференцировки возможно при активации генов, некоторых клеточных микроРНК и последующем повреждении участков генома, отвечающих за специализацию клеток. Отсутствие цитокинов, необходимых для перехода созревающих клеток к следующему этапу специализации, также может способствовать прекращению дифференцировки трансформированных клеток (в этом случае присутствие цитокина может вызвать нормализацию и продолжение дифференцировки раковых клеток - процесс, обратный канцерогенезу). Созревание трансформированных клеток приостанавливается, и они, в результате непрерывной пролиферации и подавления апоптоза, накапливаются, формируя опухоль, т.е. клон клеток, обладающих рядом особенностей, не свойственных нормальным клеткам организма. Клетки опухоли с наиболее распространённым набором хромосом образуют стволовую линию. Геномная неустойчивость, которая вызывает увеличение частоты изменений, необходима для дальнейшей прогрессии опухоли.

4 стадия – стадия прогрессии опухоли. Биологический смысл этой стадии заключается в окончательном преодолении препятствий на пути роста и распространения опухоли. Сформировавшийся опухолевый клон (стволовая линия) синтезирует собственные цитокины и идёт по пути наращивания темпов деления, уклонения от иммунного надзора организма и обеспечения интенсивного кровоснабжения. Опухолевая прогрессия носит скачкообразный характер и зависит от появления новой стволовой линии опухолевых клеток. В ходе развития опухоли благодаря её генетической нестабильности, происходит частое изменение ее клеточного состава и смена стволовой линии. Подобная стратегия роста носит адаптивный характер, так как выживают только наиболее приспособленные клетки.

Экстраклеточные нейтрофильные ловушки в развитии опухолей

Представления о роли НВЛ при онкологии сильно варьируют. С одной стороны, есть данные об антиканцерогенных свойствах НВЛ, связанных с прямым разрушением опухолевых клеток и стимуляцией иммунной системы. Цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам проявляют компоненты НВЛ (миелопероксидаза, протеиназы и гистоны), тогда как нити ДНК рассматриваются как своего рода инструмент для захвата опухолевых клеток и ограничению их дальнейшего распространения. С другой стороны, НВЛ могут способствовать миграции и иммунному избеганию опухолевых клеток. Высказано предположение о возможной роли НВЛ как прогностического биомаркера течения неопластического процесса. Раковые клетки из первичной опухоли могут распространяться в другие ткани, оставаясь бездействующими и клинически не обнаруживаемыми в течение многих лет. Мало что известно о сигналах, которые заставляют эти спящие клетки пробуждаться, возобновлять пролиферацию и развиваться в метастазы. Устойчивое воспаление легких и сопровождающее образование НВЛ могут превращать бездействующие раковые клетки в агрессивные метастазы в легких. Пробуждение этих клеток было связано с НВЛ опосредованным ремоделированием внеклеточного матрикса и могло быть предотвращено антителом против модифицированной версии матричного белка.

9. Критические точки иммунного ответа, роль в развитии онкозаболеваний.

Согласно концепции иммунного надзора над опухолями в ее современном виде, клетки иммунной системы могут модулировать рост и прогрессию злокачественного новообразования путем развития локального воспаления (прежде всего, клетками врожденной ветви иммунитета), продукцией антител, специфичных к опухоль-ассоциированным антигенам (В-клетки), контактными (NK- и NKT-клетки), а также антиген-опосредованным (цитотоксические Т-клетки) цитолизом опухолевой клетки.

Однако опухолевые клетки способны подавлять направленный против них иммунный ответ двумя способами: во-первых, избегая иммунологического надзора путем уменьшения экспрессии молекул HLA или продукцией неканонических форм этих молекул, а также уменьшая экспрессию опухоль-ассоциированных антигенов на своей поверхности, и, во-вторых, непосредственно блокируя активацию Т-лимфоцитов, вызывая анергию опухоль-специфичных клонов. В последнем случае один из молекулярных механизмов эвазии основан на передаче ингибирующего сигнала от рецепторов CTLA-4 или PD-1 на цитотоксических Т-лимфоцитах.

Молекула CTLA-4, так же как и родственная ей молекула CD28, экспрессируется исключительно на Т-лимфоцитах и относится к корецепторам TCR (рис. 3, см. 3-ю стр. обложки). Гены, кодирующие CTLA-4 и CD28, дуплицировались в ходе эволюции и находятся в непосредственной близости друг от друга на хромосоме 2q33 человека. Продукты обоих генов формируют гомодимеры, которые взаимодействуют с классическими коstimуляторными молекулами CD80 и CD86 (B7.1 и B7.2) с различными константами аффинности.

Важно, что CTLA-4 связывается с молекулой CD80 в 16 раз сильнее, нежели CD28, и, таким образом, выигрывает в конкуренции за лиганд при экспрессии на поверхности клетки [45]. Сам CD28 является ключевым активирующим корецептором для TCR, и дополнительный сигнал с него необходим для продуктивной активации Т-клетки при ее взаимодействии с комплексом антигенный пептид-молекула МНС. Без коstimуляции Т-клетка способна распознать антиген, но отсутствие амплификации сигнала переводит ее в состояние анергии, т.е. делает неспособной осуществлять

эффекторную стадию иммунного ответа. Близкородственный CD28 рецептор CTLA-4 является не активирующим, а ингибирующим, и его главная функция состоит в предупреждении возникновения аутоиммунных реакций и гиперактивации Т-клеток. CTLA-4 эффективно конкурирует с CD28 за костимуляторные лиганды и тем самым модулирует иммунный ответ.

Механизмы ингибирующего воздействия CTLA-4 на Т-клетки до сих пор остаются предметом дискуссий. По-видимому, можно выделить два типа подобных воздействий: внеклеточный и внутриклеточный. Внеклеточный включает в себя секрецию растворимой формы CTLA-4, продукцию индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), а также вовлечение в иммунный ответ регуляторных Т-клеток. Внутриклеточный же механизм CTLA-4-зависимого ингибирования подразумевает конкуренцию с CD28 за лиганд, блокирование экспрессии липидных рафтов и формирования иммунологического синапса. Недавно было показано, что на поверхности Т-клетки может происходить опосредованный CTLA-4 транс-эндоцитоз, удаляющий CD80/86 с поверхности антиген-презентирующей клетки.

Рецептор PD-1 был впервые идентифицирован по увеличению экспрессии на тимоцитах в ответ на проапоптотический стимул. Дальнейшие исследования связали функцию этого рецептора с иммунологической толерантностью. Как и CTLA-4, PD-1 относится к семейству CD28 и имеет 23% гомологии с CTLA-4 по аминокислотной последовательности. При антигенной стимуляции PD-1 привлекает тирозин-фосфатазу SHP-2 к мотиву ITSM, в результате чего дефосфорилируются сигнальные молекулы, такие как Syk и PI3K. В отличие от CTLA-4, PD-1 экспрессируется не только на активированных Т-клетках, но и на В-клетках и на клетках миелоидного ряда, что, по-видимому, указывает на более широкий спектр функций в регуляции работы иммунной системы. Известны два лиганда рецептора PD-1: PD-L1 и PD-L2 (B7-H1 и B7-DC соответственно), принадлежащие к семейству B7. Можно представить взаимодействие опухоли и иммунной системы в виде так называемого опухолево-иммунологического цикла, в котором каждый из шагов опухолевой прогрессии регулируется теми

или иными механизмами иммунитета. Первым шагом цикла является высвобождение опухоль-ассоциированных антигенов, что приводит к презентации их на поверхности антиген-презентирующих клеток, которые далее мигрируют в лимфатические узлы, дренирующие опухолевый очаг, где и происходит активация Т-клеток (шаг 2). Активированные Т-клетки проникают в кровеносные сосуды, по которым путешествуют в опухолевый очаг, инфильтрируют его (шаг 3), распознают опухолевые клетки, несущие на своей поверхности пептиды опухоль-ассоциированных антигенов в контексте молекул главного комплекса гистосовместимости, и убивают их (шаг 4).

«Классические» ИКТ (опосредованные CTLA-4, PD-1) действуют на второй шаг опухолево-иммунологического цикла (активация реактивных Т-клонов).

10. Современные биотехнологические методы лечения опухолей (генная терапия, технология CRISPR/Cas9, таргетная терапия, антитела).

Генная терапия — лечение болезней при помощи введения или наоборот удаления генов.

Генная терапия использует 3 основных подхода.

Активация генов самого организма, чтобы «отключить» действия гена-мутанта.

Фетальная генотерапия. Чужую ДНК вводят в эмбрион на ранней стадии развития. Внесенная информация передается и следующим поколениям.

Соматическая генотерапия. Дополнительные гены вводят в соматические клетки, т. е. в те, которые не принимают участия в половом размножении. «Отредактированный» вариант ДНК потомкам не передается, но технология улучшает состояние пациента.

Существуют 2 метода генной терапии.

Первый основан на том, что ученые помещают нужную информацию в кольцевую молекулу ДНК. Потом ее внедряют в клетку организма. Недостаток метода в том, что процедуру нужно повторять, т. к. клетки постоянно обновляются.

Использование вирусов как носителей генной информации. Медицинские генетики убирают у вируса белки, которые отвечают за его способность вызывать болезнь. В его ДНК остается только информация, как проникать в клетку организма.

Преимущество вируса в том, что он сам находит нужную клетку в организме. Вирус гепатита внедряется в печень, а вирус герпеса — в нейроны. Но процесс невозможно контролировать, поэтому есть риск развития раковых заболеваний.

В свою очередь иммунная система человека стремится уничтожить вирус. В таком случае иммунитет «убивает» вирус до того, как он внедрился в клетку и «отремонтировал» поломку в генетическом коде. Другая опасность — организм может ответить чрезмерно сильной иммунной реакцией, которая ухудшит состояние пациента.

Одно из самых перспективных открытий в области генотерапии — **система CRISPR/Cas9**. Ученые обнаружили бактерии, стойкие к вирусным инфекциям. Их ДНК включает особую последовательность генов (CRISPR). Они вырабатывают РНК, которая связывается с ДНК вируса и обозначает чужеродный фрагмент. Далее его «вырезает» белок Cas9.

CRISPR/Cas9 может починить часть гена, ответственную за самоуничтожение клеток. Таким образом они теряют способность к постоянному делению. Пока исследования показали свою эффективность на отдельных извлеченных из организма клетках.

Модификация лейкоцитов при помощи методов генной терапии. Клетки «учатся» распознавать и уничтожать рак. В США одобрен уже второй такой препарат против лейкемии.

Уничтожение раковых клеток при помощи вирусов с измененными генами.

Вирусы, которые могут быть использованы для генной терапии рака

Вирус кори не вызывает защитного ответа в раковых клетках

Вирус герпеса способен переносить длинные последовательности «встроенных» генов

Лентивирус (производный от ВИЧ) может «встроить» гены в неделящиеся клетки

Ретровирус встраивается в чужой геном и обеспечивает стабильность изменений

Таргетная терапия или молекулярно-таргетная («молекулярно-прицельная») терапия (англ. target «цель, мишень») является одним из значительных направлений медикаментозного лечения (фармакотерапии) рака. Как вид молекулярной медицины, таргетная терапия блокирует рост раковых клеток с помощью вмешательства в механизм действия конкретных целевых (таргетных) молекул, необходимых для канцерогенеза и роста опухоли, а не просто препятствуя размножению всех быстро делящихся клеток (как, например, делает традиционная химиотерапия).

Многие таргетные методы лечения являются примерами **иммунотерапии** (так как используют иммунные механизмы для терапевтических целей), разрабатываемой в области онкоиммунологии. Таким образом, являясь иммуномодуляторами, они представляют собой один из типов модификаторов биологического ответа.

Наиболее успешные таргетные методы лечения используют химические вещества, которые нацелены или преимущественно нацелены на какой-либо белок

или фермент, который несёт мутацию или другие генетические изменения, являющиеся специфичными для раковых клеток и не присутствуют в нормальной ткани хозяина. Одним из наиболее успешных молекулярных таргетных лекарственных препаратов является Гливек (Gleevec), который представляет собой ингибитор киназы с исключительной сродством к гибриднему белку BCR-ABL, который является важным фактором онкогенеза при хроническом миелолейкозе. Несмотря на наличие целого ряда других показаний, Гливек является наиболее эффективным в отношении BCR-ABL. Другие примеры молекулярно-таргетных препаратов, подавляющих мутировавшие онкогены, включают PLX27892 который нацелен на мутантный B-Raf при меланоме.

Существуют таргетные препараты для лечения рака молочной железы, множественной миеломы, лимфомы, рака предстательной железы, меланомы и других раковых заболеваний.

11. Генно-модифицированные организмы: определение, способы получения, области применения, правовые аспекты получения и использования в России и мире.

ГМО — организм, генотип которого был искусственно изменён при помощи методов генной инженерии. Это определение может применяться для растений, животных и микроорганизмов. Всемирная организация здравоохранения даёт более узкое определение, согласно которому генетически модифицированные организмы — это организмы, чей генетический материал (ДНК) был изменен, причём такие изменения были бы невозможны в природе в результате размножения или естественной рекомбинации.

Генетические изменения, как правило, производятся в научных или хозяйственных целях. Генетическая модификация отличается целенаправленным изменением генотипа организма в отличие от случайного, характерного для естественного и искусственного мутационного процесса.

Цели создания ГМО

Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН (FAO) рассматривает использование методов генетической инженерии для создания трансгенных сортов растений либо других организмов как неотъемлемую часть сельскохозяйственной биотехнологии. Прямой перенос генов, отвечающих за полезные признаки, является естественным развитием работ по селекции животных и растений, расширивших возможности селекционеров в части управляемости процесса создания новых сортов и расширения его возможностей, в частности, передачи полезных признаков между нескрещивающимися видами.

Использование как отдельных генов различных видов, так и их комбинаций в создании новых трансгенных сортов и линий является частью стратегии FAO по характеристике, сохранению и использованию генетических ресурсов в сельском хозяйстве и пищевой промышленности.

Основные этапы создания ГМО:

Получение изолированного гена.

Введение гена в вектор для переноса в организм.

Перенос вектора с геном в модифицируемый организм.

Преобразование клеток организма.

Отбор генетически модифицированных организмов и устранение тех, которые не были успешно модифицированы.

Методы осуществления каждого из этих этапов составляют в совокупности методы генетической инженерии.

Процесс синтеза генов в настоящее время разработан очень хорошо и даже в значительной степени автоматизирован. Существуют специальные аппараты, снабжённые ЭВМ, в памяти которых закладывают программы синтеза различных нуклеотидных последовательностей. Такой аппарат синтезирует отрезки ДНК длиной до 100—120 азотистых оснований (олигонуклеотиды).

Чтобы встроить ген в вектор, используют ферменты — рестриктазы и лигазы. С помощью рестриктаз ген и вектор можно разрезать на кусочки. С помощью лигаз такие кусочки можно «склеивать», соединять в иной комбинации, конструируя новый ген или заключая его в вектор.

Техника введения генов в бактерии была разработана после того, как Фредерик Гриффит открыл явление бактериальной трансформации. В основе этого явления лежит примитивный половой процесс, который у бактерий сопровождается обменом небольшими фрагментами нехромосомной ДНК, плазмидами. Плазмидные технологии легли в основу введения искусственных генов в бактериальные клетки. Популярными методами введения вектора в клетку растений является использование почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens* или генной пушки. Для генетической инженерии животных используют трансфекцию, вектора, на основе ретровирусов и другие методы.

Если модификации подвергаются одноклеточные организмы или культуры клеток многоклеточных, то на этом этапе начинается клонирование, то есть отбор тех организмов и их потомков (клонов), которые подверглись модификации. Когда же поставлена задача получить многоклеточные организмы, то клетки с изменённым генотипом используют для вегетативного размножения растений или вводят в бластоцисты суррогатной матери, когда речь идёт о животных. В результате рождаются детёныши с изменённым или неизменным генотипом, среди которых отбирают и скрещивают между собой только те, которые проявляют ожидаемые изменения.

Применение

В исследованиях

В настоящее время генетически модифицированные организмы широко используются в фундаментальных и прикладных научных исследованиях. С помощью генно-модифицированных организмов исследуются закономерности развития некоторых заболеваний (болезнь Альцгеймера, рак), процессы старения и регенерации, изучается функционирование нервной системы, решается ряд других актуальных проблем биологии и современной медицины.

В медицине и фармацевтической промышленности

Генетически модифицированные организмы используются в прикладной медицине с 1982 года. В этом году зарегистрирован в качестве лекарства генно-инженерный человеческий инсулин, получаемый с помощью генетически модифицированных бактерий. В настоящее время фармацевтическая промышленность выпускает большое количество лекарственных средств на основе рекомбинантных белков человека: такие белки производят генетически модифицированные микроорганизмы, либо генетически модифицированные клеточные линии животных. Генетическая модификация в данном случае заключается в том, что в клетку интродуцируется ген белка человека (например, ген инсулина, ген интерферона, ген бета-фоллитропина). Эта технология позволяет выделять белки не из донорской крови, а из ГМ-организмов, что снижает риск инфицирования препаратов и повышает чистоту выделенных белков. Ведутся работы по созданию генетически модифицированных растений, продуцирующих компоненты вакцин и лекарств против опасных инфекций

(чумы, ВИЧ). На стадии клинических испытаний находится проинсулин, полученный из генетически модифицированного сафлора. Успешно прошло испытания и одобрено к использованию лекарство против тромбозов на основе белка из молока трансгенных коз.

Бурно развивается новая отрасль медицины — генотерапия. В её основе лежат принципы сходные с использующимися при создании ГМО, но в качестве объекта модификации выступает геном соматических клеток человека. В настоящее время генотерапия — один из главных методов лечения некоторых заболеваний. Так, уже в 1999 году каждый четвёртый ребёнок, страдающий SCID, лечился с помощью генной терапии. Генотерапию, кроме использования в лечении, предлагают также использовать для замедления процессов старения.

В сельском хозяйстве

Генная инженерия используется для создания новых сортов растений, устойчивых к неблагоприятным условиям среды и вредителям, обладающих лучшими ростовыми и вкусовыми качествами.

Проходят испытания генетически модифицированные сорта лесных пород со значительным содержанием целлюлозы в древесине и быстрым ростом.

В животноводстве

Методом генного редактирования удалось создать свиней, которые потенциально устойчивы к африканской свиной чуме. Изменение пяти «букв» в коде ДНК гена RELA у выращиваемых на фермах животных, позволило получить вариант гена, который, предположительно защищает их диких сородичей: бородавочников и кустарниковых свиней от этого заболевания.

Другие направления

Разрабатываются генетически модифицированные бактерии, способные производить экологически чистое топливо.

В 2003 году на рынке появилась GloFish — первый генетически модифицированный организм, созданный с эстетическими целями, и первое домашнее животное такого рода. Благодаря генной инженерии популярная аквариумная рыбка Данио рерио получила несколько ярких флуоресцентных цветов.

В 2009 году выходит в продажу ГМ-сорт розы «Applause» с цветами «синего цвета» (на самом деле они сиреневые).

Регулирование

В некоторых странах создание, производство, применение продукции с использованием ГМО подлежит государственному регулированию. В том числе и в России, где исследовано и одобрено к применению несколько видов трансгенных продуктов.

До 2014 года в России ГМО можно было выращивать только на опытных участках, был разрешён ввоз некоторых сортов (не семян) кукурузы, картофеля, сои, риса и сахарной свёклы (всего 22 линии растений). С 1 июля 2014 г. должно было вступить в силу Постановление Правительства Российской Федерации от 23 сентября 2013 г. № 839 «О государственной регистрации генно-инженерно-модифицированных организмов, предназначенных для выпуска в окружающую среду, а также продукции, полученной с применением таких организмов или содержащей такие организмы». 16 июня 2014 года Правительством РФ принято постановление № 548 о переносе срока вступления в силу постановления № 839 на 3 года, то есть на 1 июля 2017 года.

В феврале 2015 года в Госдуму внесен законопроект о запрете на выращивание ГМО в России, который был принят в первом чтении в апреле 2015. Запрет не касается использования генномодифицированных организмов (ГМО) для проведения экспертиз и

научно-исследовательских работ. Согласно законопроекту, правительство сможет запрещать ввоз в Россию генно-модифицированных организмов и продукции по результатам мониторинга их воздействия на человека и окружающую среду. Импортеры генно-модифицированных организмов и продукции будут обязаны пройти регистрационные процедуры.

12. Общая схема молекулярного клонирования. Основные типы клонирующих векторов. Доставка рекомбинантной ДНК и РНК в клетку. Проблемы экспрессии чужеродных генов. Выделение генетически модифицированных организмов и проблема удаления маркерных генов. Проблемы генетической стабильности генно-модифицированных организмов.

Общая схема молекулярного клонирования

1. Получение нужной последовательности нуклеотидов (гена).

ДНК для клонирования может быть получена путем: а) непосредственного расщепления геномной ДНК эндонуклеазами рестрикции, б) синтеза ДНК методом ПЦР, в) обратной транскрипцией мРНК, или г) химико-ферментативным синтезом.

а) Эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы) – это высокоспецифичные бактериальные ферменты, которые узнают определенные последовательности оснований в двухцепочечной молекуле ДНК и расщепляют обе цепи в определенном месте.

Различные рестриктазы образуют различную форму концов при расщеплении ДНК, которые могут быть 5'-выступающими одноцепочечными (рис. 2.1, EcoR I, Sfi I), 3'-выступающими (Pst I) или полностью двухцепочечными – «**тупыми**» (Sma I). Выступающие одноцепочечные концы, если они комплементарны, получили название «**липких**», поскольку такие концы могут гибридизоваться. Наличие липких концов у фрагментов ДНК существенно облегчает их ковалентное сшивание специальным ферментом **ДНК-лигазой**, который формирует фосфодиэфирную связь между соседними нуклеотидами.

б) Появление метода **полимеразной цепной реакции (ПЦР)** в 1983 г. существенно продвинуло, ускорило и удешевило молекулярное клонирование. *За изобретение ПЦР американский ученый К. Мюллис получил Нобелевскую премию.*

ПЦР представляет собой серию из трех циклически повторяющихся стадий реакции (15–30 циклов по 1–3 мин):

- 1) тепловая денатурация исходной ДНК при ~94 °С;
- 2) отжиг (прикрепление) ДНК-затравок (праймеров) при ~50–60°С на получившиеся одноцепочечные матрицы. В качестве **праймеров** используются короткие (15–25 нуклеотидных оснований) одноцепочечные ДНК – олигонуклеотиды, комплементарные концам целевого фрагмента ДНК;
- 3) синтез двухцепочечных ДНК при 72 °С с каждым из праймеров навстречу друг другу по противоположным цепям ДНК. Синтез осуществляют термостабильные ДНК-полимеразы, способные сохранять активность на протяжении всей реакции ПЦР, несмотря на воздействие высоких температур на стадии тепловой денатурации ДНК.

По завершении каждого цикла количество синтезированного продукта удваивается и происходит увеличение количества исходных копий ДНК в геометрической прогрессии.

в) Если в качестве матрицы для синтеза используют **матричную РНК**, первым шагом в синтезе целевой последовательности будет синтез комплементарной ДНК (**кДНК**) обратной транскриптазой (ревертазой – РТ), затем обычная ПЦР.

г) Когда организм-донор ДНК не доступен или когда нуклеотидная последовательность природного гена может плохо транслироваться в выбранном организме-реципиенте, применяют **химико-ферментативный синтез**. При этом производят сборку полноразмерного гена из отдельных синтетических олигонуклеотидов.

2. После обработки рестриктазами полученный ген соединяют (лигируют) с клонирующим вектором с образованием новой, рекомбинантной молекулы. Вектор для клонирования – общий термин, обозначающий молекулу ДНК, способную к включению чужеродной ДНК и к автономной репликации, служит инструментом для введения генетической информации в клетку.

Основные типы клонирующих векторов:

а) Плазмидные векторы – это кольцевые двухцепочечные молекулы ДНК, имеющие клонирующий лимит (размер нуклеотидной последовательности, который можно присоединить к вектору) до ~10 тпн (тысяч пар нуклеотидов). Плазмиды найдены практически у всех исследованных бактерий и у дрожжей.

Каждая плазида содержит сайт инициации репликации (ориджин, *ori*), специфичность которого определяет круг хозяев плазмиды, некоторые могут реплицироваться только в клетках одного вида, другие имеют широкий спектр хозяев.

Основным недостатком плазмидных векторов является их малая емкость в отношении клонируемых фрагментов ДНК. Выраженное делетирование больших вставок чужеродной ДНК в плазидах связано с тем, что селективное преимущество в бактериях получают плазмиды с минимальным временем репликации.

б) Вирусные векторы. Самый распространенный вектор - **бактериофаг лямбда** имеет линейную молекулу ДНК с 48,5 тпн. Центральную треть вирусного генома можно заменить чужеродной ДНК без нарушения жизненного цикла фага.

Бакуловирусы – большая и разнообразная группа вирусов. Поражают насекомых и других членистоногих, но абсолютно безвредны для позвоночных. Замена несущественной для репликации части вирусного генома позволяет клонировать чужеродную ДНК до 15 тпн.

Для клеток высших эукариот эффективные векторы созданы на основе хромосомной ДНК ретровирусов, аденовирусов вируса герпеса и др.

При использовании вирусов в качестве векторов для животных клеток никогда не сохраняется нативный вирус – используются лишь некоторые регуляторные последовательности вируса для конструирования вектора.

в) Искусственные хромосомы.

Бактериальные искусственные хромосомы (bacterial artificial chromosomes – BAC) сконструированы на основе полового фактора F *E. coli* со строгим контролем репликации. Его генетическая система обеспечивает правильное распределение фактора F между делящимися клетками и поддерживает его копияемость в 1-2 молекулы на клетку. BAC-векторы позволяют клонировать фрагменты ДНК в 75–300 тпн.

Искусственные хромосомы млекопитающих (mammalian artificial chromosomes – MAC). Благодаря наличию основных структурных элементов обычных хромосом такие мини-хромосомы длительно удерживаются в клетках и способны нести полноразмерные гены и их естественные регуляторные элементы, которые необходимы для правильной работы гена.

3. Полученную рекомбинантную конструкцию вводят в клетку-мишень (реципиент), где она реплицируется и передается потомкам. В зависимости от типа вектора и схемы эксперимента рекомбинантная ДНК может либо реплицироваться автономно, либо встроиться в хромосому клетки-хозяина.

Типы доставки рекомбинантной ДНК в клетку

а) Трансформация (для прокариот) – это процесс поглощения рекомбинантной ДНК компетентными клетками, индуцированный температурным фазовым переходом клеточной мембраны. Чтобы обеспечить внедрение в клетки *E. coli* плазмидной ДНК, клетки выдерживают с ледяным раствором CaCl_2 и ДНК, а затем подвергают тепловому шоку при 42°C в течение ~ 1 мин. В результате такой обработки происходит локальное разрушение клеточной стенки и клетка поглощает рекомбинантную ДНК.

б) Конъюгация. Существуют бактериальные плазмиды, обладающие способностью создавать межклеточные контакты, через которые они и переходят из одной клетки в другую. При этом конъюгативная плаزمида может увлекать за собой обычный плазмидный вектор, находящийся в той же клетке. Таким образом можно трансформировать клетки-реципиенты, с трудом поддающиеся трансформации другими способами.

в) Вирусная инфекция. Для внедрения векторов на основе вирусов широко используется природный инфекционный путь заражения клетки-хозяина, который зависит от типа вируса.

г) Электропорация – временное создание пор в бислойной липидной мембране под кратким воздействием электрического поля.

д) Трансфекция (для эукариот) – введение ДНК в эукариотические клетки с помощью различных химических реагентов.

Одним из первых разработанных методов эффективной трансфекции была инкубация ДНК с ДЕАЕ-декстраном. Механизм действия ДЕАЕ-декстрана окончательно не установлен, но известно, что он связывается с ДНК и с клеточной мембраной, стимулируя пиноцитоз, хотя сам клетками не захватывается. К недостаткам метода стоит отнести токсичность ДЕАЕ-декстрана и очень малую частоту получения стабильных трансфектантов.

Революцией явилось введение в практику первого низкотоксичного катионного липида ДОТМА (1,2-диолеил -3-N,N,N-триметиламинопропан). Эффективность трансфекции с использованием катионного липида была приблизительно в 100 раз больше относительно любого другого химического реагента, причем с большой долей стабильных трансгенных клеток.

е) Микроинъекция – клеточная мембрана прокалывается микроиглой и раствор, содержащий ДНК, вводится в цитоплазму клетки или напрямую в ядро, если ядро достаточно большое (например, ядро яйцеклетки). Микроинъекция ДНК в клетки млекопитающих стала возможной с появлением прибора для изготовления микропипеток диаметром 0,1–0,5 мк и микроманипулятора. Метод очень эффективен, доля клеток со стабильной интеграцией и экспрессией инъецированных генов может достигать 50 %.

4. Используя селективный маркер, идентифицируют и отбирают клетки, несущие рекомбинантную ДНК. Например, высевают трансформированные клетки на селективную среду с антибиотиком, ген устойчивости к которому несет использованный вектор – расти будут только колонии (клоны) рекомбинантных клеток.

5. Получают специфический белковый продукт, синтезированный клетками - хозяевами, что служит подтверждением клонирования искомого гена.

Проблемы экспрессии чужеродных генов

Основная задача биотехнологии – получение в больших количествах функционально активного белка в природной конформации. Еще одним условием биотехнологического производства считается минимизация затрат на единицу продукции. Чем проще организм, тем проще и дешевле культивирование его клеток.

Самым простым вариантом экспрессии является бактериальная экспрессия, но в прокариотических организмах невозможны многие посттрансляционные модификации и правильное сворачивание (фолдинг) многих эукариотических белков.

Посттрансляционные модификации:

1. Образование дисульфидных связей. Эту реакцию катализирует фермент дисульфидизомераза. Неправильно уложенный белок оказывается нестабильным и неактивным.

2. Протеолитическое расщепление предшественника, удаление определенного участка полипептидной цепи с образованием функционально активного белка.

3. Гликозилирование – присоединение специфического сахарного остатка к серину, треонину (О-гликозилирование), или к аспарагину (N-гликозилирование) – основная модификация, благодаря которой белки приобретают стабильность.

4. Модификации аминокислот в составе белка: фосфорилирование, ацетилирование, ацилирование, гамма-карбоксилирование, сульфатирование, миристилирование, пальмитоилирование и др.

Уровень экспрессии чужеродного гена также зависит от конструкции экспрессионной кассеты вектора. Регуляторные элементы чужеродного гена должны хорошо работать в клетке-хозяине. Кроме того, для лучшей экспрессии гена на уровне трансляции мРНК желательно приблизить набор кодонов к типичному для клетки-хозяина. Обычно для этого посредством направленных точечных мутаций заменяют «редкие» кодоны на синонимичные «частые», что не сказывается на первичной структуре белка. В результате экспрессия гена в различных системах может быть усилена до 300 раз.

Клетки дрожжей, млекопитающих и насекомых могут осуществлять часть или все посттрансляционные модификации синтезируемых рекомбинантных белков, но их использование в качестве биопродукторов ограничено высокой себестоимостью выхода рекомбинантных белков по сравнению с прокариотическими клетками.

13. Классические методы генетической модификации растений (простая селекция, межвидовое скрещивание, соматическая гибридизация, индуцированный мутагенез).

Простая селекция

Самый простой метод генетической модификации растений, используемый нашими предками и продолжающийся сегодня, – это простая селекция. То есть проверяется генетически гетерогенная популяция растений, и для дальнейшего размножения отбираются «превосходящие» особи – растения с наиболее желательными признаками, такими как улучшенные вкусовые качества и урожайность. Семена высших растений высевают для получения растений нового поколения, все или большинство из которых будут нести и выражать желаемые черты. В течение нескольких лет эти растения или их семена сохраняются и пересаживаются, что увеличивает популяцию высших растений и смещает генетическую популяцию так, что в ней доминирует высший генотип. Этот очень старый метод разведения был усовершенствован с помощью современных технологий.

Межвидовое скрещивание

Межвидовое скрещивание происходит, когда селекционер берет пыльцу с одного растения и наносит ее на пестик совместимого растения, производя гибрид, который несет гены от обоих родителей. Когда гибридное потомство достигает цветущей зрелости, оно также может быть использовано в качестве родителя.

Селекционеры обычно хотят объединить полезные свойства двух растений. Например, они могут добавлять ген устойчивости к болезням от одного растения к другому, который является высокоурожайным, но восприимчивым к болезням, оставляя при этом любые нежелательные генетические признаки устойчивых к болезням растений, такие как плохая фертильность и урожайность семян, восприимчивость к насекомым или другим заболеваниям.

Из-за случайной природы рекомбинации генов и признаков в скрещенных растениях селекционерам обычно приходится делать сотни или тысячи гибридных потомков, чтобы создать и идентифицировать те немногие, которые обладают полезными свойствами с минимумом нежелательных признаков. Например, большинство потомства может демонстрировать желаемую устойчивость к болезням, но у некоторых также могут присутствовать нежелательные генетические особенности устойчивых к болезням родителей. Скрещивание по-прежнему является основой современной селекции растений, но многие другие методы были добавлены в набор инструментов селекционеров.

Межвидовое скрещивание может происходить различными способами. Тесно родственные виды, такие как культивируемый овес (*Avena sativa*) и его относительно слабый относительный дикий овес (*Avena fatua*), могут перекрестно опылять для обмена генетической информацией, хотя обычно это не так. Гены одного вида также могут естественным образом интегрироваться в геномы более отдаленных родственников при определенных условиях. Некоторые пищевые растения могут нести гены, происходящие из разных видов, передаваемые как природой, так и человеком.

Соматическая гибридизация

Недавние достижения в области технологий тканевых культур предоставили новые возможности для рекомбинации генов из разных растительных источников. При соматической гибридизации, процессе, также известном как слияние клеток, клетки, растущие в культуральной среде, лишаются защитных стенок, обычно с использованием ферментов пектиназы, целлюлазы и гемицеллюлазы. Эти раздетые клетки, называемые протопластами, объединяются из разных источников и, благодаря использованию различных методов, таких как поражение электрическим током, сливаются друг с другом.

Когда два протопласта сливаются, полученный соматический гибрид содержит генетический материал из обоих растительных источников. Этот метод преодолевает физические барьеры для гибридизации на основе пыльцы, но не основные хромосомные несовместимости. Если соматический гибрид является совместимым и здоровым, он может вырастить новую клеточную стенку, начать митотическое деление и в конечном итоге вырасти в гибридное растение, которое несет генетические особенности обоих родителей. Хотя слияния протопластов легко осуществить, поскольку почти все растения (и животные) имеют клетки, подходящие для этого процесса, относительно немногие способны регенерировать весь организм, и еще меньше способны к половому размножению. Этот метод не-генной инженерии не распространен в селекции растений, поскольку

Индукцированный мутагенез

Размножение мутаций включает воздействие на растения или семена мутагенных агентов (например, ионизирующих излучений) или химических мутагенов (например, этилметансульфонат), чтобы вызвать случайные изменения в последовательности ДНК. Селекционер может отрегулировать дозу мутагена так, чтобы этого было достаточно, чтобы вызвать некоторые мутации, но недостаточно, чтобы быть смертельным. Как правило, большое количество растений или семян подвергаются мутации,

выращиваются до репродуктивной зрелости и получают потомство. Потомство оценивают на фенотипическую экспрессию потенциально ценных новых признаков.

Как и в случае соматоклональных вариаций, подавляющее большинство мутаций, возникающих в результате этой техники, являются вредными, и только случайность определяет, появятся ли какие-либо генетические изменения, полезные для человека. Кроме изменения дозировки, нет средств для контроля эффектов мутагена или для нацеливания на определенные гены или признаки. Мутагенные эффекты, по-видимому, являются случайными по всему геному, и, даже если полезная мутация происходит в конкретном растении, также могут возникать вредные мутации. Как только о полезная мутация идентифицирована, селекционеры работают над уменьшением вредных мутаций или других нежелательных свойств мутированного растения. Тем не менее, зерновые культуры, полученные в результате селекции мутаций, все еще могут нести изменения ДНК, выходящие за рамки специфической мутации, которая обеспечила превосходную черту.

Культуры с индуцированной мутацией в большинстве стран (включая Соединенные Штаты) не регулируются в отношении безопасности пищевых продуктов или окружающей среды, и селекционеры, как правило, не проводят молекулярно-генетический анализ таких культур, чтобы охарактеризовать мутации или определить их степень. Следовательно, почти наверняка, что мутации, отличные от тех, которые приводят к выявленным полезным признакам, также встречаются и могут быть неочевидными, оставаясь не охарактеризованными с неизвестными эффектами.

14. Основные методы генно-инженерной модификации растений (микробные векторы, бомбардировка микрочастицами, электропорация, транспозоны).

Микробные векторы

Agrobacterium tumefaciens — это естественный почвенный микроорганизм, наиболее известный как вызывающий заболевание косматого корня у восприимчивых видов растений. Это необычный патоген, потому что, когда он заражает хозяина, он переносит часть своей собственной ДНК в растительную клетку. Переданная ДНК стабильно интегрируется в растительную ДНК, а затем растение считывает и экспрессирует переданные гены, как если бы они были его собственными. Перенесенные гены управляют производством нескольких веществ, которые опосредуют развитие косматых корней.

Среди этих веществ есть одна или несколько необычных непротеиновых аминокислот, называемых опинами. Опины перемещаются по всему растению, поэтому пища, полученная из зараженных коронным галлом растений, будет нести эти опины. В начале 1980-х годов были разработаны штаммы *Agrobacterium*, в которых отсутствовали вызывающие болезнь гены, но сохранялась способность прикрепляться к чувствительным растительным клеткам и переносить ДНК.

Подставляя ДНК, представляющую интерес, в ДНК, вызывающую болезнь желчного венца, ученые получили новые штаммы *Agrobacterium*, которые доставляют и стабильно интегрируют специфический новый генетический материал в клетки целевых видов растений. Если трансформированная клетка затем регенерируется в цельное фертильное растение, все клетки в потомстве также несут и могут экспрессировать вставленные гены. *Agrobacterium* — это природный генно-инженерный агент, ответственный за большинство растений GE в промышленном производстве.

Бомбардировка микрочастицами

Кляйн обнаружил, что обнаженная ДНК может доставляться в растительные клетки путем «стрельбы» в них микроскопическими шариками, к которым была прикреплена ДНК. Это грубый, но эффективный физический метод доставки ДНК, особенно у таких видов, как кукуруза, рис и другие зерновые, которые *Agrobacterium* не трансформирует естественным образом. Многие растения в промышленном производстве были первоначально преобразованы с помощью доставки микрочастиц.

Электропорация

При электропорации растительные протопласты поглощают макромолекулы из окружающей их жидкости, чему способствует электрический импульс. Клетки, растущие в культуральной среде, лишаются защитных стенок, в результате чего образуются протопласты. Подача известной ДНК в культуральную среду протопластов и последующее применение электрического импульса временно дестабилизирует клеточную мембрану, позволяя ДНК проникать в клетку. Трансформированные клетки могут затем регенерировать свои клеточные стенки и расти до целых, плодородных трансгенных растений. Электропорация ограничена низкой эффективностью большинства видов растений для регенерации из протопластов.

Микроинъекция

ДНК может быть введена непосредственно в закрепленные клетки. Некоторая часть этих клеток выживет и интегрирует введенную ДНК. Однако этот процесс является трудоемким и неэффективным по сравнению с другими методами.

Транспозоны / транспонируемые элементы

Гены большинства видов растений и некоторых животных (например, насекомых и рыб) несут транспозоны, которые представляют собой короткие, встречающиеся в природе фрагменты ДНК со способностью перемещаться из одного места в другое в геноме. Барбара МакКлинтон впервые описала такие переносимые элементы в растениях кукурузы в 1950-х годах. Транспозоны были тщательно исследованы в исследовательских лабораториях, особенно для изучения мутагенеза и механики рекомбинации ДНК. Тем не менее, они еще не были использованы для доставки новой генетической информации для улучшения товарных культур.

15. Классические методы модификации животных (искусственный отбор, клонирование).

Приручение и искусственный отбор

Современные породы домашнего скота заметно отличаются от своих предков в результате стратегий разведения. Например, производство молока на корову увеличилось среди молочного скота голштинской породы. Аналогичным образом, программы разведения привели к постным, быстрорастущим свиньям. Каждый из цыплят современных пород производит более 250 яиц в год, примерно в два раза больше, чем в 1950 году, опять же, в основном, из-за генетического отбора.

Установленные и появляющиеся биотехнологии в животноводстве включают вспомогательные репродуктивные технологии; использование природных гормонов, таких как рекомбинантный бычий соматотропин; отбор с помощью маркера; биотехнологии для повышения репродуктивной эффективности без воздействия на геном; и биотехнологии для усиления экспрессии желаемых генов.

Вспомогательные репродуктивные процедуры

Современные породы домашнего скота отличаются от своих предков, потому что использование замороженной спермы для искусственного осеменения, наряду с тестированием производителей и отбором производителей, заметно повлияло на

генетическое качество домашнего скота, особенно молочного скота. Отобранные быки проверяются на фертильность и оцениваются на основе молока, которое производят их дочери. Ярким примером является молоко от коров голштинской породы, которое выросло почти в три раза в период с 1945 по 1995 год благодаря комбинации искусственного интеллекта с использованием спермы из отобранных быков и улучшению управления производством молока. Использование сложных статистических моделей для прогнозирования ценностей размножения, тестирование и отбор производителей, скрещивание и отбор с помощью маркеров, наряду с искусственным осеменением, значительно улучшили производственные характеристики скота.

Клонирование

Клонирование животных – искусственное получение генетически идентичных организмов с помощью экспериментальных манипуляций с яйцеклетками (ооцитами) и ядрами соматических клеток животных *in vitro* и *in vivo*, подобно тому, как в природе появляются однояйцевые близнецы.

Клонирование животных достигается в результате переноса ядра из дифференцированной клетки в неоплодотворенную яйцеклетку, у которой удалено собственное ядро (энуклеированная яйцеклетка), с последующей пересадкой реконструированной яйцеклетки в яйцевод приемной матери. Первые успешные опыты по клонированию животных были проведены в середине 1970-х гг. английским эмбриологом Дж. Гордоном (Gordon) в экспериментах на амфибиях, когда замена ядра яйцеклетки на ядро из соматической клетки взрослой лягушки привела к появлению головастика. Это показало, что техника трансплантации ядер из соматических клеток взрослых организмов в энуклеированные ооциты позволяет получать генетические копии организма, послужившего донором ядер дифференцированных клеток, и стало основанием для вывода об обратимости эмбриональной дифференцировки генома по крайней мере у земноводных. Однако долгое время все попытки применить описанный выше метод для клонирования млекопитающих были безуспешными. Значительный вклад в решение этой проблемы был сделан шотландской группой исследователей из Рослинского института и компании «PPL Therapeuticus» (Шотландия) под руководством Яна Вильмута (Wilmut). В 1996 появились их публикации по успешному рождению ягнят в результате трансплантации ядер, полученных из фибробластов плода овцы, в энуклеированные ооциты. В конечном виде проблема клонирования животных была решена группой Вильмута в 1997, когда родилась овца по имени Долли — первое животное, полученное из ядра взрослой соматической клетки: собственное ядро ооцита, было заменено на ядро клетки из культуры эпителиальных клеток молочной железы взрослой лактирующей овцы.

В дальнейшем были проведены успешные эксперименты по клонированию различных млекопитающих с использованием ядер, взятых из взрослых соматических клеток животных (мышь, коза, свинья, корова). Появление технологии клонирования животных вызвало не только большой научный интерес, но и привлекло внимание крупных компаний и финансового бизнеса во многих странах. Подобные работы ведутся и в России, но целенаправленной программы исследований не существует.

В целом технология клонирования животных еще находится в стадии развития. У большого числа полученных таким образом организмов наблюдаются различные патологии, приводящие к внутриутробной гибели или гибели сразу после рождения.

Использование технологии клонирования предоставляет уникальную возможность получать фенотипически и генетически идентичных животных, которые могут быть использованы для решения различных теоретических и практических задач, стоящих перед биомедициной и сельским хозяйством. В частности, использование

клонирования животных должно способствовать изучению проблемы тотипотентности дифференцированных клеток, развития и старения организмов, злокачественного перерождения клеток. Благодаря технологии клонирования появилась возможность ускоренной генетической селекции и тиражирования животных с рекордными производственными показателями. В сочетании с трансгенозом (см. Трансгенные животные) клонирование животных открывает дополнительные возможности для производства ценных биологически активных белков, используемых для лечения различных заболеваний человека. Клонирование животных позволит проводить испытания медицинских препаратов на идентичных животных. В медицине представляется перспективной клеточная терапия на базе использования клонированных клеток. Такие клетки должны компенсировать недостаток и дефект собственных клеток организма и, главное, не будут отторгаться при трансплантации. Технология клонирования животных позволит, по-видимому, осуществлять и широкомасштабную ксенотрансплантацию органов, т. е. замену отдельных органов человека на соответствующие органы клонированных животных.

16. Генно-инженерная модификация животных (восстановление эмбрионов, перенос и суперовуляция; *in vitro* созревание и оплодотворение ооцитов; трансфекция; технология Knock-In и Knock-Out).

Восстановление эмбрионов, перенос и суперовуляция

Восстановление и перенос эмбрионов позволяют ценным животным вносить больше потомства в генофонд. Эмбрионы, которые замораживаются и хранятся перед использованием для начала беременности, дают от 40 000 до 50 000 телят в год. Появляющиеся технологии позволят разделить сперму и эмбрионы по полу, чтобы контролировать пол потомства. Производство однополых сперматозоидов путем сортировки клеток X и Y сперматозоидов принесет большую пользу животноводству.

***In vitro* созревание и оплодотворение ооцитов**

До нескольких тысяч эмбрионов может быть получено с использованием методов извлечения и созревания незрелых яиц или ооцитов примерно за один день в среде, содержащей гормоны, с последующим оплодотворением их живой спермой или инъекцией одной спермы или головки спермы в их внешние слои - либо под *zonapellucida*, либо непосредственно в цитоплазму. Полученные зиготы культивируют *in vitro*, обычно до стадии бластоцисты, перед передачей самкам- реципиентам. Коммерческое применение созревания и оплодотворения *in vitro* привело к тому, что за один год рождается до 4000 телят.

Расщепление эмбрионов

Расщепление или деление пополам эмбрионов приводит к появлению зиготных близнецов или клонов не-GE, которые генетически идентичны как по ядерным, так и по митохондриальным генам. Материнские близнецы демонстрируют большую вариабельность фенотипа, чем отцовские близнецы только с одной X- хромосомой. Кроме того, существует вероятность того, что различия в распределении митохондриальной ДНК будут влиять на фенотип.

Эти эмбрионы затем помещаются в пустую *zona pellucida* и передаются реципиентам, которые переносят их на срок. В течение 2001 года в результате расщепления эмбрионов было получено в общей сложности 2226 зарегистрированных клонов голштинской породы - 754 мужчин и 1472 женщин - от 1 до 2 процентов телят.

Трансфекция

Некоторые из методов, используемых для трансфекции или введения новых генов в животных, аналогичны тем, которые используются для растений. Обычно используемые методы включают в себя:

- микроинъекция ДНК в ядро якорных клеток;
- электропорация, где ДНК вводится через поры клеточной мембраны с помощью импульсных электрических зарядов;
- поликатионная нейтрализация клеточной мембраны и вводимой ДНК для улучшения пассивного поглощения;
- липофекция, где ДНК; и
- опосредованная спермой трансфекция, часто используемая в сочетании с внутрицитоплазматической инъекцией сперматозоидов или электропорацией.

Как и в случае с растениями, микроинъекция является крайне неэффективным средством создания трансгенных животных. Например, невероятно небольшой процент эмбрионов домашнего скота, которые подвергаются микроинъекции, дают трансгенных животных. Более того, успешно введенные микроорганизмы трансгенным животным не обязательно передают свои трансгены потомству (NRC, 2002).

Технология Knock-In и Knock-Out

Трансгенная технология может также использоваться для создания организмов, в которых отсутствуют специфические гены, или организмов, в которых один существующий ген был заменен другим, который был сконструирован. Добавление («выбивание») или удаление («выбывание») специфических функций генов посредством введенных мутаций или генной инженерии, основанной на гомологичной рекомбинации, стало обычным явлением у животных, используемых для экспериментов, таких как мыши. Хотя в настоящее время эта технология неэффективна и, следовательно, не практична для использования при производстве домашних животных, подвергающихся отлову или нокауту, существуют примеры ее использования у домашних овец и свиней.

17. Биотехнологии в сельском хозяйстве (растения-биофабрики, решение проблемы продовольственного кризиса с помощью биотехнологий).

Проблема продовольственного кризиса в мире сейчас является наиболее острой. Не всегда можно получить хороший урожай, способный удовлетворить потребность населения, даже с плодородной почвы и в теплых широтах. С начала XXI века число жителей Земли, страдающих от голода, значительно выросло. Это связано, в первую очередь, с приростом населения, и со значительной отсталостью многих стран. В настоящее время голодают около 852 млн. человек (каждый шестой из которых является ребенком). Этот показатель на 18 млн. больше, чем к концу XX века. В каждой стране на то имеются свои причины. Во многих африканских странах — недостаток средств для покупки продовольствия и ресурсов для обработки земли. Но эта проблема касается не только бедных стран. По данным службы Гэллага, 19 % жителей США (около 60 млн. человек, включая детей) в 2011 году испытывали трудности. Это малообеспеченные люди, которые вынуждены отказывать себе в полноценном питании. В Северной Корее, например, главной причиной голода (считается, что в конце девяностых годов несколько сотен тысяч северокорейцев умерли от голода) является неэффективное сельское хозяйство. В Судане - непрекращающаяся гражданская война.

Биотехнология, названная одной из самых перспективных наук XXI века, призвана в корне изменить подход к решению этой проблемы. Так, генно-модифицированные культуры способны давать больший урожай, по сравнению с традиционными. К тому же, за 10 лет выращивания биотехнологических культур

объемы топлива и выбросов в атмосферу сократились на 14,8 млрд. кг, что равноценно снижению выбросов 6,6 млн. автомобилей. Еще такие культуры могут быть устойчивы к насекомым-вредителям и различным болезням, что позволит снизить использование пестицидов. Также растение можно сделать более устойчивым к неблагоприятным погодным условиям путем вмешательства в его ДНК. Особенно актуально это для России. Наша страна владеет огромным пространством, включая 117 млн. га пахотных земель, из которых ныне засеивается только около 50 млн. га.

Большинство выращиваемых у нас сортов дают урожай, меньший в несколько раз по сравнению со странами Европы и США. Поэтому многие фермеры предпочитают импортные семена. Чтобы решить эту проблему, многие российские институты работают в направлении развития агропромышленного комплекса России. Например, в научно-исследовательском институте зернобобовых и крупяных культур города Орла вывели новые уникальные сорта гороха, фасоли, чечевицы, сои, гречихи, проса, характеризующиеся высокой урожайностью, скороспелостью, устойчивостью к полеганию и осыпанию. Чтобы накормить 9 млрд. человек – а таким в скором времени будет население Земли – надо увеличить производительность сельского хозяйства не меньше чем на 70%. Традиционными методами сделать это невозможно, поэтому остается только один выход — биотехнологическая революция в сельском хозяйстве. Например, для увеличения производства продуктов питания были созданы новые сорта пшеницы, ячменя, подсолнечника и рапса в Австралии, США, Канаде и некоторых других странах. Такие сорта устойчивы к морозам, засухе, вредителям, соответственно, по сравнению с предыдущими годами урожайность заметно повысилась. Уже в 2009 году сельскохозяйственные культуры, которые были улучшены с помощью биотехнологии, выращивались в 25 странах мира.

В мире отмечается небывалое увеличение площадей для посева модифицированных культур. Например, биотехнологическая соя заняла более трех четвертей из 90 млн. га сои во всем мире, биотехнологический хлопчатник – почти половину из 33 млн. га хлопчатника в мире, биотехнологическая кукуруза – более четверти из 158 млн. га кукурузы в мире, а биотехнологический рапс – более пятой части из 31 млн. га всего рапса в мире. Одним из лидеров в этой области является Китай. С 2004 г., многие виды трансгенных растений были допущены к коммерческому производству, среди них — хлопчатник и пшеница, устойчивые к насекомым, биотехнологический рис и обогащенная фитазой кукуруза. Разработки в этой области ведутся в Китае и по сей день. Скорость распространения биотехнологических культур невероятно велика. Выращивание трансгенных сортов растений экономит время созревания, а стоимость таких продуктов в 2-5 раз ниже по сравнению с традиционными. И именно это делает сельскохозяйственную биотехнологию самой быстро развивающейся технологией в истории современного сельского хозяйства, способной решить проблему продовольственного кризиса во всем мире.

18. Методы очистки вод и земель, загрязненных нефтью и нефтепродуктами.

В настоящее время во всем мире широко используются следующие технологии для локальной очистки сильнозагрязненных почв:

Утилизация отходов сжиганием

Одним из методов удаления нефтяных загрязнений из почвы на месте является их уничтожение путем сжигания. Избыток нефтепродуктов предварительно собирается любым подходящим образом. Этот способ имеет множество отрицательных сторон. При его осуществлении происходит вторичное загрязнение окружающей среды за счет

образования продуктов неполного сгорания углеводородов. Наблюдается также выгорание растений, семян, органических составляющих почвы и нарушение биоценоза в целом, поэтому этот метод применим лишь в случае возникновения критической аварийной ситуации, при больших разливах нефтепродуктов, когда создается угроза источникам питьевого водоснабжения и близко расположенным грунтовым водам.

Очистка ультразвуком

Ультразвук эффективен для очистки грунта от нефтепродуктов. Начиная с критического значения звукового давления акустических волн, в жидкости возникает кавитация. При схлопывании кавитационных полостей образующиеся микроструи с линейными скоростями 300-800 м/с срывают с поверхности твердых частиц нефтяные загрязнения. Эффективность очистки может достигать 99,5–99,8%. При кавитационных разрывах жидкости происходит ионизация и активация молекул, стимулирующие окисление и полимеризацию углеводородных молекул.

Захоронение отходов на полигонах

Традиционным является выемка, вывоз и захоронение загрязненных земель в строго отведенных для этого местах – полигонах. Этот метод дешевый, но представляется не самым лучшим с точки зрения охраны окружающей среды, поскольку загрязненные нефтью грунты способны сохраняться сотни лет без изменения, являясь потенциальным источником опасности загрязнения. При создании полигонов следует уделять внимание полной и надежной их изоляции от всех компонентов природной среды.

Физико-химический способ очистки грунта

К физико-химическим способам очистки грунтов относятся обработка их в устройствах различного типа подогретыми водными растворами в присутствии поверхностно-активных веществ или других химических реагентов; экстракция нефтепродуктов из почв различными растворителями, в том числе, вакуумная экстракция и др., к их числу можно отнести также известкование загрязненных нефтью грунтов – обработку грунта негашеной известью в количестве 0,5-5% от массы разлитого нефтепродукта, в результате чего образуется твердый продукт, прочно удерживающий нефтепродукты в виде комплексных соединений.

Электрохимическая обработка загрязненных земель

Методом очистки грунта, не требующим выемки, является электрохимическая обработка. При электрохимическом методе в загрязненную почву погружаются электроды, к которым подводится постоянный электрический ток. Метод основан на том, что большинство почв содержит в порах между частицами то или иное количество водных растворов солей и поэтому обладает электропроводностью. Многие загрязняющие вещества растворяются в почвенной воде и под воздействием электрического поля перемещаются к электродам, осаждаются на них и затем извлекаются. В зависимости от свойств почвы перемещение загрязняющих веществ может происходить вследствие миграции или электроосмоса, или по обоим механизмам одновременно. Основным преимуществом электрохимического метода очистки является его применение для малопроницаемых (глинистых) почв и возможность извлечения самых разнообразных загрязнителей, включая металлы и органические соединения.

Биовентиляция

В США самым распространенным методом очистки загрязненных почв и грунтовых вод является биовентиляция. Сущность его заключается в том, что в загрязненную зону через специальные вертикальные или горизонтальные скважины нагнетается воздух в количестве, достаточном для снабжения кислородом почвенных бактерий, разлагающих органические соединения до CO₂ и воды. Под действием потока

воздуха жидкие загрязнения вместе с потоком воздуха транспортируются через почву. К моменту достижения ими поверхности большая часть загрязнений успевает разложиться под действием бактерий. Тем самым значительно снижается загрязненность отходящих газов и уменьшаются затраты на его очистку.

Биотехнологический способ очистки грунта

В настоящее время наиболее перспективным методом для очистки нефтезагрязненных почв, как в экономическом, так и в экологическом плане является биотехнологический подход, основанный на использовании различных групп микроорганизмов, отличающихся повышенной способностью к биodeградации компонентов нефтей и нефтепродуктов. Способность утилизировать трудноразлагаемые вещества антропогенного происхождения (ксенобиотики) обнаружена у многих организмов. Это свойство обеспечивается наличием у микроорганизмов специфических ферментных систем, осуществляющих катаболизм таких соединений. Поскольку микроорганизмы имеют сравнительно высокий потенциал разрушения ксенобиотиков, проявляют способность к быстрой метаболической перестройке и обмену генетическим материалом, им придается большое значение при разработке путей биоремедиации загрязненных объектов.

Под термином «биоремедиация» принято понимать применение технологий и устройств, предназначенных для биологической очистки почв, т.е. для удаления из почвы уже находящихся в ней загрязнителей.

Биоремедиация включает в себя два основных подхода:

1. биостимуляция - активизация деградирующей способности аборигенной микрофлоры внесением биогенных элементов, кислорода, различных субстратов;
2. биодополнение - интродукция природных и генноинженерных штаммов-деструкторов чужеродных соединений.

При этом обеспечивается преимущественный и избирательный рост тех микроорганизмов, которые способны наиболее эффективно утилизировать данный загрязнитель. «Активизированную» микрофлору вносят в загрязненный объект одновременно с необходимыми добавками, повышающими эффективность утилизации загрязнителя.

Существующие два пути интенсификации биodeградации ксенобиотиков в окружающей среде - стимуляция естественной микрофлоры и интродукция активных штаммов не только не противоречат, но и дополняют друг друга.

Восстановление жизненных процессов зависит от способностей почвы и воды перерабатывать органику (к каковой относятся углеводороды нефти) в безвредные для окружающей среды легкоусвояемые продукты метаболизма. Так как нефть и ее продукты, являясь тяжелыми, трудно-окисляемыми, и токсичными веществами, серьезно подавляют самоочистительные способности почвы и воды и места нефтяных разливов на многие годы остаются участками безжизненной суши или мертвыми водоемами. И все же, процессы разрушения и разложения нефтяных загрязнителей в природе идут в основном за счет содержащихся в почве и воде микроорганизмов, обладающих способностью извлекать из углеводородов энергию, необходимую для строительства новых колоний и их жизнедеятельности.

Технологии очистки воды от нефтепродуктов

Механическая очистка – фильтрация воды в несколько этапов с последующим отстаиванием. В эту категорию входят сепараторы нефтепродуктов, широко применяемые на станциях АЗС, СТО, паркингах и т. д. Для фильтрации используются фильтры с пористыми наполнителями, которые пропускают молекулы воды, но задерживают более крупные молекулы нефти, керосина, мазута и других

нефтепродуктов. Однако эффективность механической очистки ограничивается показателем примерно в 60-65%, из-за чего она используется преимущественно в качестве подготовительного этапа.

Химическая очистка. Заключается в применении специальных реагентов, добавляемых в очищаемую жидкость. Данные вещества вступают в реакцию и осаживаются в качестве нерастворимых осадков. На роль химических реагентов чаще всего используют поверхностно-активные вещества и водонефтяные эмульсии, а также специальные адсорбенты, как, например, оксид алюминия. С помощью химической очистки можно удалить до 98% загрязнений.

Биологическая очистка воды от нефти и нефтепродуктов. Наиболее передовая методика очистки, основанная на деятельности специальных микроорганизмов, для которых нефть является основным источником питания. Таких микроорганизмов существует более сотни видов и относятся они к различным категориям – грибам, бактериям, дрожжам и т. д. Они обладают полезным свойством перерабатывать сложные углеводородные соединения, т. е. нефтепродукты, вызывая их окисления. В результате образуются легко разлагающиеся вещества и нетоксичные продукты, что обеспечивает наиболее высокую степень очистки.

19. Биотехнология очистки сточных вод.

Очистка сточных вод — комплекс мероприятий по удалению загрязнений, содержащихся в бытовых и промышленных сточных водах перед выпуском их в водоёмы. Очистка сточных вод осуществляется на специальных очистных сооружениях^[1].

Процесс очистки делится на 4 этапа:

- механический
- биологический
- физико-химический
- дезинфекция сточных вод.

Механический этап

Производится предварительная очистка поступающих на очистные сооружения сточных вод с целью подготовки их к биологической очистке. На механическом этапе происходит задержание грубых и тонкодисперсных примесей.

Сооружения для механической очистки сточных вод:

- решётки (или УФС — устройство фильтрующее самоочищающееся) и сита;
- песколовки;
- первичные отстойники;
- фильтры;
- септики.

Для задержания крупных загрязнений органического и минерального происхождения применяются решётки и для более полного выделения грубодисперсных примесей — сита. Максимальная ширина прозоров решётки составляет 16 мм. Отбросы с решёток либо дробят и направляют для совместной переработки с осадками очистных сооружений, либо вывозят в места обработки твёрдых бытовых и промышленных отходов.

Затем стоки проходят через песколовки, где происходит осаждение мелких частиц (песок, шлак, битого стекла т. п.) под действием силы тяжести, и жироловки, в которых происходит удаление с поверхности воды гидрофобных веществ

путём флотации. Песок из песколовков обычно складывается или используется в дорожных работах.

Первичные отстойники, куда на следующем этапе попадает вода, предназначены для осаждения взвешенной органики. Это железобетонные резервуары глубиной три-пять метров, радиальной или прямоугольной формы. В их центры снизу подаются стоки, осадок собирается в центральный приямок проходящими по всей плоскости дна скребками, а специальный поплавок сверху сгоняет все более лёгкие, чем вода, загрязнения в бункер.

Очищенные таким образом сточные воды переходят на первичные отстойники для выделения взвешенных веществ. Снижение БПК составляет 20-40 %.

В результате механической очистки удаляется до 60-70 % минеральных загрязнений, а БПК снижается на 30 %. Кроме того, механическая стадия очистки важна для создания равномерного движения сточных вод (усреднения) и позволяет избежать колебаний объёма стоков на биологическом этапе.

Биологический этап

Аэротенк

Биологическая очистка является основным этапом очистки сточных вод. Предполагает очистку растворённой части загрязнений сточных вод (органические загрязнения — ХПК, БПК; биогенные вещества — азот и фосфор) специальным биоценозом (бактерий, простейших и многоклеточных организмов), который называется активным илом или биоплёнкой.

Могут использоваться как аэробные, так и анаэробные бактерии, в зависимости от наличия или отсутствия кислорода воздуха в иловой смеси (смеси активного ила и сточной воды). На этом основана реализация процессов аэробной очистки от органических веществ и нитрификации (окисления органических загрязнений и аммонийного азота в аэробных условиях) и денитрификации (окисления нитратов до газообразного азота в анаэробных условиях).

С технической точки зрения различают несколько вариантов биологической очистки. На данный момент основными являются варианты со свободно плавающим илом — активный ил (аэротенки), с прикреплёнными микроорганизмами на специальных носителях — биофильтры и метантенки (анаэробное брожение). Последние используются для получения из осадков природного газа (метана), так называемого биогаза.

Системы со свободно плавающим активным илом могут реализовываться в проточном режиме (аэротенк-отстойник) и в циклическом режиме (реакторы периодического действия).

Также в биологической очистке после аэротенков существует вторичные отстойники. Во вторичных отстойниках находятся илососы. Они предназначены для удаления активного ила со дна вторичных отстойников и возврат в аэротенк (возвратный ил). Лишний приращенный ил выводится из системы (избыточный ил).

Биологическая очистка основана на способности активного ила к осаждению, поэтому всегда процесс биологической очистки включает два этапа: 1. контакт активного ила с загрязнённой водой определённое время (рассчитывается по различным методикам), 2. отстаивание (процесс гравитационного разделения активного ила и очищенной воды. Для ускорения процесса илоразделения самой современной является технология мембранного разделения с применением ультрафильтрационных мембран.

Физико-химический этап

Данные методы используют для доочистки от растворённых примесей, а в некоторых случаях и от взвешенных веществ. Многие методы физико-химической очистки требуют предварительного глубокого выделения из сточной воды взвешенных веществ, для чего широко используют процесс коагуляции.

В настоящее время в связи с использованием оборотных систем водоснабжения существенно увеличивается применение физико-химических методов очистки сточных вод, основными из которых являются:

- Аэрация
- флотация;
- сорбция;
- центрифугирование;
- ионообменная и электрохимическая очистка;
- гиперfiltrация;
- нейтрализация;
- экстракция;
- эвапорация;
- выпаривание, испарение и кристаллизация.

Важным этапом при очистке сточных вод является механическое обезвоживание осадка. На данный момент существует несколько технологий обезвоживания — с помощью камерных фильтр-прессов, с помощью дисковых шнековых дегидраторов, с помощью ленточных прессов и с помощью центрифуг (декантеров). Каждая технология имеет свои плюсы и минусы (занимаемая площадь, энергопотребление, стоимости т. п.). При обезвоживании обычно используют реагент (флокулянт) для увеличения эффективности обезвоживания. В настоящее время широкое применение получает использование центрифуг для обезвоживания. Качество разделения жидкой и твёрдой фракции самое высокое из вышеупомянутых технологий.

Дезинфекция сточных вод

Для окончательного обеззараживания сточных вод, предназначенных для сброса на рельеф местности или в водоём, применяют установки ультрафиолетового облучения.

Для обеззараживания биологически очищенных сточных вод, наряду с ультрафиолетовым облучением, которое используется, как правило, на очистных сооружениях крупных городов, применяется также обработка хлором в течение 30 минут.

Хлор уже давно используется в качестве основного обеззараживающего реагента практически на всех очистных сооружениях в городах России. Поскольку хлор довольно токсичен и представляет опасность, очистные предприятия многих городов России уже активно рассматривают другие реагенты для обеззараживания сточных вод, такие как гипохлорит, дезавид (сам реагент и его компоненты не входят в список разрешённых к применению в целях обеззараживания. В ЕС основной компонент запрещён с 09.02.2010) и озонирование.

20. Утилизация твердых отходов с помощью биотехнологических производств.

Захоронение на полигонах является самым распространенным в мире методом утилизации отходов. Этот метод применяют к несгораемым отходам и к отходам, которые при горении выделяют токсичные вещества.

Полигоны, на которых утилизируют отходы, не являются обычными свалками. Современные полигоны — это сложные инженерные сооружения, на которых установлены системы борьбы с загрязнениями воздуха и подземных вод. Некоторые

полигоны умеют перерабатывать образующийся в процессе гниения мусора газ в тепло и электроэнергию. К сожалению, всё это в большей степени относится к развитым европейским странам, так как в России до сих пор очень малый процент полигонов соответствует этим характеристикам.

Главный минус захоронения отходов — даже при использовании многочисленных фильтров и систем очистки этот вид утилизации не позволяет полностью избавиться от негативных эффектов разложения отходов — гниения и ферментации — загрязняющих воздух и воду. Поэтому, несмотря относительную дешевизну захоронения ТБО, экологи рекомендуют перерабатывать отходы, тем самым минимизируя риски загрязнения окружающей среды.

Сжигание ТБО позволяет в 3 и более раз уменьшать вес отходов. При этом при сжигании устраняется запах и уничтожаются токсичные бактерии. Кроме того, энергию, выделяемую при сжигании твердых бытовых отходов, можно использовать для получения тепла и электричества.

Несмотря на свои преимущества, этот вид утилизации мусора имеет существенный недостаток — сильное загрязнение окружающей среды. При сжигании мусора в воздух выбрасываются такие опасные вещества, как бифенилы, диоксины, дибензофураны и тяжелые металлы. Кроме того, до сих пор окончательно не решен вопрос с безопасным захоронением токсичной золы. Сегодня во многих странах Европы владельцы мусоросжигательных заводов тратят значительные средства на установку воздухоочистительных систем и захоронение золы. За счет этого существенно увеличивается стоимость строительства таких заводов, составляя в среднем 150 млн долларов.

Компостирование широко применяется для переработки отходов растительного происхождения. Это технология основана на естественном биологическом разложении органического мусора. Результатом такой переработки мусора является компост, который применяют в сельском хозяйстве. Сегодня активно используются технологии получения смешанного компоста за счет переработки донных отложений водоемов и осадков сточных вод.

Вторичная переработка — самый безопасный для окружающей среды метод переработки мусора. Кроме того, для многих владельцев заводов по переработке ТБО она является дополнительной прибылью за счет продажи отсортированного мусора (стеклобой, пластик, картон) перерабатывающим компаниям. К сожалению, лишь некоторая часть отходов поддается вторичной переработке, поэтому полностью решить вопрос о безопасной утилизации ТБО до сих пор невозможно.

21. Биотехнологическая очистка атмосферного воздуха.

Для биологической очистки воздуха применяют **три типа установок: биофильтры, биоскрубберы и биореакторы с омываемым слоем.**

В качестве носителя для **фильтрующего слоя** используют природные материалы - компост, торф и др. Эти материалы содержат в своем составе различные минеральные соли и вещества, необходимые для развития микроорганизмов. Поэтому в биофильтры не вносят каких-либо минеральных добавок. Воздух, подлежащий очистке, подается вентилятором в систему, проходит через фильтрующий слой в любом направлении, снизу - вверх или - наоборот. При этом воздух должен проходить через всю массу фильтрующего слоя равномерно. Поэтому требуется однородность слоя и определенная степень влажности.

Оптимальная для очистки воздуха влажность фильтрующего слоя составляет 40-60 % от веса материала носителя. При недостаточной влажности материала фильтрующего слоя в нем образуются трещины, материал пересыхает. Это затрудняет прохождение воздуха и снижает физиологическую активность микроорганизмов. Увлажнение материала обеспечивается распылением воды на поверхности фильтрующего слоя. При избыточной влажности в толще слоя происходит образование анаэробных зон с высоким аэродинамическим сопротивлением. В результате снижается время контакта потока воздуха с поглотителем и падает эффективность очистки.

В толще фильтрующей массы не должно образовываться более плотных зон или комков материала, что возможно при использовании компоста, так как при этом снижается удельная площадь поверхности фильтрующего слоя. В материале не должно возникать температурных градиентов, а также не должно происходить резких изменений pH среды. Поэтому температурный режим в биофильтре поддерживается постоянным. Для этого воздух, подаваемый в биофильтр, подогревается, установка в целом термостатируется.

Для обеспечения стабильной работы биофильтров следует соблюдать комплекс мер, важнейшими из которых являются следующие.

Воздух, подаваемый на очистку в биофильтр, предварительно увлажняют в биоскруббере до относительной влажности в 95-100 %. При заполнении фильтрующего слоя для снижения аэродинамического сопротивления в материал добавляют гранулы (диаметром 3-10 мм) из синтетических полимерных материалов (полиэтилена, полистирола), а также частицы автопокрышек, активированный уголь. Масса добавок составляет от 30 до 70 % от массы фильтрующего материала.

Для предотвращения резкого закисления материала фильтрующего слоя в ходе трансформации органики в него добавляют известняк или карбонат кальция в количестве 2-40 % от веса носителя. С целью избежания ситуаций, когда микроорганизмы, входящие в состав рабочего тела биофильтра, могут ингибироваться токсическими веществами в результате, например, залповых выбросов, в материал вносят активированный уголь, до 250 кг/м³.

Эффективность работы биофильтра определяется газодинамическими параметрами фильтрующего слоя, спектром и концентрацией присутствующих в воздухе веществ и ферментативной активностью микроорганизмов-деструкторов. При этом скорость удаления вредных примесей из воздуха в процессе биоочистки может лимитироваться как диффузией веществ из газовой фазы в биокаталитический слой, так и скоростью протекания биохимических реакций в микробных клетках. При высокой входной концентрации вредных веществ в воздухе процесс их деструкции в ходе прохождения потока через фильтрующий слой неравномерен. Сначала разрушаются легкодоступные вещества, и только в конце процесса начинается разрушение труднодеградируемых соединений. Так, при присутствии в воздухе в качестве вредных примесей комплекса соединений (бутанола, этилацетата, бутилацетата и толуола) последний утилизируется микроорганизмами только после окисления всех остальных веществ.

Стационарное состояние и наиболее высокая скорость биоочистки наступают спустя некоторое время после запуска биофильтра. Требуется некоторый период для созревания и адаптации микробиологического ценоза. Длительность периода адаптации зависит от концентрации веществ в воздухе и микробного пейзажа в диффузионном слое и может составлять от нескольких часов до нескольких недель. Концентрация микроорганизмов в ходе очистки возрастает и может стать избыточной. Поэтому

периодически материал фильтрующего слоя приходится обновлять. Длительность циклов достаточно велика и составляет несколько лет.

Принцип функционирования биоскрубберов отличается тем, что процесс очистки воздуха реализуется в две стадии в двух различных установках. На первом этапе в абсорбере токсические вещества, находящиеся в воздухе, а также кислород, растворяется в воде. В результате воздух выходит очищенным, а загрязненная вода далее следует на очистку. Применяют различные типы абсорберов (барботажные, насадочные, распылительные, форсуночные и т.д.). Цель конструктивных усовершенствований заключается в увеличении площади поверхности раздела фаз, газовой и жидкости. Это определяет эффективность абсорбции. На второй стадии загрязненная вода поступает в аэротенк, где она регенерируется. Очистление воды в аэротенке происходит по обычной схеме с участием кислорода. В ходе очистки сложные органические вещества окисляются микроорганизмами, формирующими активный ил, до конечных продуктов с образованием биомассы.

Биореактор с омываемым слоем: рабочим телом этой биосистемы являются иммобилизованные микроорганизмы. Биослой реактора представляет собой гранулы с иммобилизованными микробными клетками. Этот слой омывается водой, содержащей необходимые для развития клеток минеральные вещества. Загрязненный воздух проходит через него, при этом вещества, подлежащие деструкции, диффундируют в водную пленку, покрывающую частицы биокатализатора, и далее окисляются микроорганизмами. Скорость деструкции может лимитироваться скоростью диффузии веществ из газовой фазы в жидкую, а также скоростью протекания реакций в микробных клетках. Скорость диффузии, в свою очередь, зависит от природы токсических веществ и их концентраций. Стационарный режим биореактора с омываемым слоем после его запуска наступает через 5-10 дней. При использовании заранее адаптированных к очищаемым веществам микроорганизмов этот срок может быть сокращен до нескольких часов. Периодически, обычно раз в несколько месяцев, биослой очищают от избытка биомассы и наполняют свежими гранулами.

Основные требования, предъявляемые к установкам биологической очистки газов, заключаются в простоте и эксплуатационной надежности конструкции, высокой удельной производительности и высокой степени очистки. Удельная производительность установки измеряется отношением объема воздуха, прошедшего через нее за 1 ч., к общему объему установки.

22. Биоремедиация земель.

Микроорганизмы-деструкторы

В настоящее время выделяют следующие типы процессов микробной трансформации органических веществ: 1) окисление; 2) восстановление; 3) декарбоксилирование; 4) дезаминирование; 5) гидролиз; 6) метилирование; 7) этирификация; 8) дегидратация; 9) конденсация; 10) изомеризация; 11) аминирование; 12) ацетилирование; 13) амидирование; 14) нуклеотизация.

Наиболее изученный и широко используемый в промышленности процесс – реакция окисления.

Углеводороды нефти. Принято, что основную роль в деградации углеводородов нефти в почве играет бактериальная микрофлора, о чем свидетельствует большая численность бактерий по сравнению с грибами. Практически все эти организмы являются аэробными хемогетеротрофами, хотя среди них встречаются и фотогетеротрофные. К наиболее распространенным бактериям-деструкторам нефти

относятся виды р. *Pseudomonas*: *Ps. putida*, *Ps. paucimobilis*, *Ps. vesicularis*, *Ps. desmolytica*, *Ps. dacunae*, *Ps. longa*, *Ps. pelliculosa* и другие. Широкая распространенность этих организмов неслучайна. Они лучше приспособлены к использованию жидких легкокипящих *n*-алканов (C5-C10) и ароматических углеводородов, чем дрожжи и микобактерии. Наиболее часто отмечается использование полициклических углеводородов как единственного источника углерода и энергии представителями рода *Pseudomonas*. Активными бактериями, разлагающими углеводороды, являются и нокардиоподобные бактерии, объединяемые в род *Rhodococcus*. Они участвуют в ассимиляции газообразных, жидких *n*-алканов, ароматических углеводородов. Поэтому бактерии родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus* считаются наиболее перспективными группами, на основе которых создаются биопрепараты, используемые для биodeградации углеводородов (алифатических, ароматических, полициклических).

Пестициды. Псевдомонады оказались эффективными и при разложении такого хлорсодержащего гербицида, как ацетохлор. 140 *Ps. oleovorans* в состоянии разлагать до 98% ацетохлора при концентрации 7,6 мг/л. А штаммы *Pseudomonas* sp., *Ps. fluorescens*, *Ps. paucimobilis* были успешно использованы для биodeградации ипродиона в почве. В целом разложение пестицидов могут производить микроорганизмы разных систематических групп. Например, выделенные из почвенных образцов на рисовом поле *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Micrococcus* sp., *Proteus* sp. способны производить разложение линдана

Синтетические поверхностно-активные вещества (СПАВ). Процессы деструкции многих СПАВ в природе происходят очень медленно, так как у микробного населения отсутствует адаптация к этим веществам. Тем не менее они подвержены процессам естественной биodeградации. К этим процессам относится окисление, скорость которого зависит от структуры веществ, температуры окружающей среды, pH, присутствия иных веществ и т. п. Они окисляются отдельными видами бактерий родов *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia* и грибов *Aspergillus*, *Penicillium*. Есть указания на гидролитический характер некоторых процессов. Из промышленных отходов было выделено 13 штаммов бактерий, представленных грамположительными и грамотрицательными формами, относящихся к родам *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Kocuria*, *Stenotrophomonas*, *Proteus*, *Staphylococcus*. Изучение физиолого-биохимических свойств показало, что все изоляты способны усваивать углерод, азот и фосфор как основные источники энергии в органической и минеральной форме; обладают протеолитической, липолитической, эмульгирующей и фунгицидной активностью; способны усваивать основные компоненты сточных вод. При изучении их деструктивной способности по отношению к СПАВ установлено, что все штаммы способны к деградации анионных и катионных СПАВ. Это позволяет рассматривать возможность использования бактериальных культур для разработки способов очистки водных сред от СПАВ.

23. Альтернативные источники энергии: виды, способы получения, достоинства/недостатки.

Нетрадиционная энергетика, исходя из названия, соответствует получению энергии нетрадиционными методами. Наибольшее применение этих методов освоено среди возобновляемых источников энергии, к которым относятся энергии солнца, ветра, геотермальная энергия, биотопливо, энергии морских волн, водородная энергетика.

Солнечная энергия основана на преобразовании энергии солнца, в результате которого получается электрическая и тепловая энергии. Получение электрической

энергии основано на физических процессах, происходящих в полупроводниках под воздействием солнечных лучей, получение тепловой – на свойствах жидкостей и газов.

Для генерации электрической энергии комплектуются солнечные электростанции, основой которой служат солнечные батареи, изготавливаемые на основе кристаллов кремния.

Преимуществом солнечной энергии является общедоступность и неисчерпаемость источника, безопасность для окружающей среды, генерация энергии в малых масштабах, бесшумность и стационарность.

К недостаткам солнечной энергии относится зависимость от погоды и времени суток, необходимость аккумуляции энергии, высокая стоимость конструкции.

Энергия ветра специализируется на преобразовании кинетической энергии воздушных масс в атмосфере в электрическую, механическую, тепловую или в любую другую форму энергии, удобную для использования в народном хозяйстве. Такое преобразование может осуществляться такими агрегатами, как ветрогенератор для получения электрической энергии, ветряная мельница для преобразования в механическую энергию, парус для использования в транспорте и другими.

Преимущество энергии ветра является экологическая чистота, разработанные ветроэнергоустановки, способные эффективно работать при самом слабом ветре, а недостатком является непостоянство ветра.

Геотермальные источники энергии основаны на использовании тепловой энергии недр Земли для производства электрической энергии на геотермальных электростанциях или, непосредственно, для отопления или горячего водоснабжения. Её принято разделять на два вида: гидротермальную и петротермальную энергию. Первый образуется за счет теплых источников, а второй тип – это разница температур на поверхности и в глубине земли. Пар, поступающий из недр земли, работает в непосредственном контакте с паровой турбиной. Пар подается на лопасти турбины, которая свое вращательное движение передает генератору, вырабатывающему электрический ток.

Главным преимуществом геотермальных источников – это практическая неиссякаемость и полная независимость от условий окружающей среды, времени года, суток. Недостаток – необходимость обратной закачки отработанной воды, это исключает сброс этих вод в природные водоёмы, расположенные на поверхности.

Биотопливо – топливо из растительного или животного сырья, из продуктов жизнедеятельности организмов или органических промышленных отходов. Различается жидкое биотопливо для двигателей внутреннего сгорания, например, этанол, метанол, биодизель, твёрдое биотопливо – дрова, брикеты, топливные гранулы, щепа, солома, лузга и газообразное – синтез-газ, биогаз, водород.

Более половины биотоплива составляют его традиционные формы – дрова, растительные остатки и сушёный навоз для отопления домов и приготовления пищи.

Их используют более трети населения Земли. Основной формой биотоплива в электроэнергетике являются паллеты, производимые из древесины.

Преимуществом биотоплива является экологическая чистота, удобство транспортировки, очень малая зольность, низкая вероятность самовоспламенения. Недостаток биотоплива – помещение для хранения.

Водородная энергетика – отрасль энергетики, основанная на использовании водорода, в качестве средства для аккумулирования, транспортировки и потребления энергии. Водород выбран как наиболее распространенный элемент на поверхности земли и в космосе, теплота сгорания водорода наиболее высока, а продуктом сгорания в кислороде является вода, которая вновь вводится в оборот водородной энергетики.

Применение водорода нашел в химической промышленности – при синтезе аммиака, изготовления соляной и метиловой кислот, получения метилового спирта. В пищевой промышленности его используют для превращения жидких жиров в твердые.

Учитывая «невесомость» водорода, им заполняли и заполняют оболочки летательных аппаратов легче воздуха. Сначала это были воздушные шары, позднее – аэростаты и дирижабли, на сегодняшний день – метеорологические зонды. Высокая температура горения, а в сочетании с электрической дугой она достигает 4000^оС, обеспечивает расплав даже самых тугоплавких металлов. Поэтому кислородно-водородные горелки используют для сварки и резки металлов. В цветной металлургии восстановлением водорода получают особо чистые металлы из оксидов. В космической технике отечественная ракета-носитель «Энергия» с успехом использует водород в качестве топлива.

Гидроэлектроэнергия является крупнейшим источником возобновляемой энергии, обеспечивая 3,3 % мирового потребления энергии и 15,3 % мировой генерации электроэнергии в 2010 году.

В России гидроэнергетика играет важную роль по объему производимой электроэнергии. Этому способствует богатство природных водных ресурсов страны. На сегодняшний день в стране действует порядка 300 мини ГЭС. Гидроэнергетические установки малой мощности способны производить от 1 до 3000 кВт/ч. Одной из крупнейших гидроэлектростанций в России является Саяно-Шушенская ГЭС имени П.С. Непорожного. Установленная мощность Саяно-Шушенской ГЭС – 6 400 МВт, среднегодовая выработка 24 млрд. кВт·ч. Тем не менее работа ГЭС сталкивается с рядом экологических проблем. После сооружения Саяно-Шушенской ГЭС в её нижнем бьефе в зимний период стала возникать незамерзающая полынья, связанная со сбросом относительно тёплых вод из водохранилища при работе гидроагрегатов ГЭС. Возникновение полыньи привело к усилению заторных явлений в нижнем бьефе с периодическим подтоплением территорий. Начальный озеровидный участок водохранилища в Туве, на который приходится около 20 % полезной ёмкости водохранилища, в результате колебаний уровня воды в водохранилище при сезонном регулировании стока заполняется в середине августа и обсыхает в середине ноября, образуя в остальное время года обширную заболоченную и непригодную для хозяйственной деятельности низменность.

4. ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ И КРИТЕРИИ ОЦЕНИВАНИЯ ПРОМЕЖУТОЧНОЙ АТТЕСТАЦИИ

4.1. Порядок проведения промежуточной аттестации

Формой промежуточной аттестации является зачет.

Зачет сдается после освоения всех разделов дисциплины в форме устного поименного опроса.

Порядок представления для инвалидов

Оценочные средства для инвалидов и лиц с ограниченными возможностями здоровья выбираются с учетом их индивидуальных психофизических особенностей.

При необходимости инвалидам и лицам с ограниченными возможностями здоровья предоставляется дополнительное время для подготовки ответа на задания.

При проведении процедуры оценивания результатов обучения инвалидов и лиц с ограниченными возможностями здоровья предусматривается использование технических средств, необходимых им в связи с их индивидуальными особенностями.

Эти средства могут быть предоставлены ЧелГУ или могут использоваться собственные технические средства.

Процедура оценивания результатов обучения инвалидов и лиц с ограниченными возможностями здоровья по дисциплине предусматривает предоставление информации в формах, адаптированных к ограничениям их здоровья и восприятия информации:

- для лиц с нарушениями зрения: в печатной форме увеличенным шрифтом; в форме электронного документа; в форме аудиофайла; в печатной форме шрифтом Брайля;
- для лиц с нарушениями слуха: в печатной форме; в форме электронного документа.
- для лиц с нарушениями опорно-двигательного аппарата: в печатной форме; в форме электронного документа; в форме аудиофайла.

Данный перечень может быть конкретизирован в зависимости от контингента обучающихся.

При проведении процедуры оценивания результатов обучения инвалидов и лиц с ограниченными возможностями здоровья по дисциплине обеспечивается выполнение следующих дополнительных требований в зависимости от индивидуальных особенностей обучающихся:

- инструкция по порядку проведения процедуры оценивания предоставляется в доступной форме (устно, в письменной форме, в письменной форме шрифтом Брайля, устно с использованием услуг сурдопереводчика);
- доступная форма предоставления заданий оценочных средств (в печатной форме, в печатной форме увеличенным шрифтом, в печатной форме шрифтом Брайля, в форме электронного документа, задания зачитываются ассистентом, задания предоставляются с использованием сурдоперевода);
- доступная форма предоставления ответов на задания (письменно на бумаге, набор ответов на компьютере, письменно на шрифте Брайля, с использованием услуг ассистента, устно).

При необходимости для обучающихся инвалидов и обучающихся с ограниченными возможностями здоровья процедура оценивания результатов обучения по дисциплине может проводиться в несколько этапов

4.2. Критерии оценивания промежуточной аттестации по видам оценочных средств

Критерии оценивания зачета

- **«Зачтено»** - студент глубоко и полно владеет содержанием учебного материала и понятийным аппаратом; умеет связывать теорию с практикой, иллюстрировать примерами, фактами, данными научных исследований; осуществляет межпредметные связи. Делает выводы; логично, четко. Ясно и кратко излагает ответы на поставленные вопросы; умеет обосновывать свои суждения и профессионально- личностную позицию по излагаемому вопросу. Ответ носит самостоятельный характер.
- **«Не зачтено»** - студент имеет разрозненные, бессистемные знания: не умеет выделять главное и второстепенное; допускает ошибки в определении понятий, формулировке теоретических положений; беспорядочно и неуверенно излагает материал; не умеет применять знания для обоснования и объяснения фактов, не устанавливает межпредметные связи.

4.3. Результаты промежуточной аттестации и уровни сформированности компетенций

При подведении итогов учитываются результаты текущей аттестации.

Особенности проведения процедуры оценивания результатов обучения инвалидов и лиц с ограниченными возможностями здоровья обозначены в рабочей программе дисциплины (модуля).

«1 уровень» - ознакомление (иметь общее представление, узнавать);

«2 уровень» - понимание учебного материала, излагаемого в учебнике, методической разработке или преподавателем;

«3 уровень» - умение логично, последовательно, достаточно полно и точно излагать изученный материал;

«4 уровень» - творчески использовать полученные знания.

Для удовлетворительной (положительной) оценки знаний требуется минимум 3-й уровень усвоения учебного материала.

**06.04.01 Биология, ОПОП Медико-биологические науки,
Микробиология и вирусология, Биотехнология, ФОС РПД
Современные проблемы биотехнологии, форма обучения очная**

Проректор по учебной работе утверждено 24.02.2025 А.А. Саламатов

Ученым советом биологического факультета

Протокол заседания № 6 от 21.02.2025

Председатель Ученого совета

биологического факультета согласовано Д.С. Сташкевич

Заседанием кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии

Протокол заседания № 6 от 21.02.2025

Заведующий кафедрой согласовано А. Л. Бурмистрова

Автор (составитель) Ю.Ю. Филиппова

**Структура рабочей программы соответствует приказу ректора ФГБОУ
ВО «ЧелГУ» от «13» апреля 2021 г. № 247-1**